

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



MOLUSCOS BIVALVES E IMPACTE AMBIENTAL: CAFÉINA E BIOMARCADORES DE EFEITO

Carolina Feijó Pinto Ventura

Dissertação orientada pela
Professora Doutora Cristina M. M. Almeida
e coorientada pela Professora Doutora Alexandra Cravo

Mestrado em Qualidade Alimentar e Saúde

2019

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



MOLUSCOS BIVALVES E IMPACTE AMBIENTAL: CAFEÍNA E BIOMARCADORES DE EFEITO

Carolina Feijó Pinto Ventura

Dissertação orientada pela
Professora Doutora Cristina M. M. Almeida
e coorientada pela Professora Doutora Alexandra Cravo

Mestrado em Qualidade Alimentar e Saúde

2019

Resumo

Este estudo avaliou a qualidade de diversas espécies de moluscos bivalves, com diferentes estratégias alimentares, de dois ecossistemas marinhos, Ria de Alvor e Ria Formosa, através da avaliação morfométrica (índice de condição), fisiológica (determinação de biomarcadores) e nutricional (água, matéria gorda, proteínas, hidratos de carbono e minerais). Para essa avaliação também se quantificou a cafeína nestes organismos (biomarcador de exposição) e no seu *habitat* (contaminante ambiental), assim como, alguns biomarcadores de efeito, nomeadamente, acetilcolinesterase (AChE), peroxidação lipídica (LPO) e o sistema de transporte de eletrões (ETS).

A quantificação de cafeína nos moluscos bivalves e nas águas marinhas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de ultra-violeta-visível (HPLC-UV), após pré-tratamento das amostras pelo método QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) e de extração em fase sólida (SPE), respetivamente. O método foi aplicado à monitorização de ambas as amostras após otimização das condições de ensaio. Os resultados foram confirmados por cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massa *tandem* (HPLC-MS/MS).

Os métodos de QuEChERS-HPLC-UV e de SPE- HPLC-UV não apresentam sensibilidade adequada à deteção da cafeína nos moluscos bivalves ($< 0,36 \mu\text{g/g}$) e nas águas marinhas ($< 0,26 \text{ mg/L}$), respetivamente. Deste modo, a cafeína foi quantificada nos extratos de ambas as amostras por HPLC-MS/MS.

Nas águas marinhas as concentrações de cafeína variaram entre os 18 ng/L (Alvor #1) e 83 ng/L (Olhão). A maioria dos moluscos bivalves (82%) apresentou cafeína, cuja concentração variou entre 0,27 ng/g para o mexilhão (Ludo) e 5,7 ng/g para o lingueirão (Alvor #1). Os dados de cafeína na água refletem somente as condições do momento da amostragem enquanto os de concentração nos tecidos dos bivalves reflectem a integração da sua bioacumulação ao longo da vida dos indivíduos.

O teor em proteínas nos moluscos bivalves variou entre 6% (berbigão) e 11% (ostra). A matéria gorda variou entre 0,6% (lingueirão) e 2,1% (ostra). O mexilhão é a espécie com maior teor em minerais (3,6%) e o lingueirão corresponde à espécie com maior teor em hidratos de carbono (3,2%). O teor de água (humidade) variou entre os 80% e 87%.

O índice de condição (IC) médio variou entre 18% (ostra) e 68% (lingueirão).

Os biomarcadores de efeito apresentaram uma resposta diferenciada para as diferentes espécies: a amêijoia-boia de Olhão registou a menor atividade da AChE, o mexilhão da Praia de Faro os maiores níveis de LPO e lingueirão de Alvor #1 a maior atividade da ETS.

Globalmente, observou-se uma correlação positiva entre a cafeína e o IC, na qual os indivíduos mais robustos bioacumulam mais cafeína nos seus tecidos. Porém a cafeína isoladamente não é um fator de *stress* e não justifica as variações do IC para os vários moluscos bivalves. O IC médio intra-específico foi superior nos bivalves pertencentes à Ria Formosa. Na Ria Formosa, registaram-se níveis de AChE e LPO inferiores mas níveis de ETS superiores comparativamente com a Ria de Alvor.

Os níveis de cafeína nas águas marinhas e nos moluscos bivalves sugerem que as concentrações não foram suficientemente elevadas para inibir a AChE e verificou-se que os indivíduos maiores desenvolvem uma maior atividade da AChE. Os dados também sugerem que o aumento deste biomarcador pode dever-se exclusivamente ao aumento das suas dimensões. A correlação entre a cafeína e a LPO e entre o IC e o LPO não é significativa. Em relação à atividade da ETS verificou-se que os indivíduos maiores e com maiores concentrações de cafeína, também apresentaram maior atividade da ETS, o que pode sugerir que estes indivíduos estão sob maior *stress* fisiológico.

A avaliação global dos três biomarcadores de efeito sugere que a cafeína isoladamente não está diretamente associada ao aumento do *stress* oxidativo destes organismos e que este *stress* também é provocado por outros fatores, nomeadamente outros contaminantes, fatores ambientais (temperatura, oxigénio e salinidade) e/ou bióticos.

Palavras-chave: moluscos bivalves, cafeína, biomarcadores, Ria de Alvor, Ria Formosa.

Abstract

The quality of several bivalve molluscs species, with different feeding strategies from two marine ecosystems, Ria de Alvor and Ria Formosa, was evaluated through morphometric (condition index), physiological (biomarker determination) and nutritional (water, fat, protein, carbohydrate and mineral) determinations. Caffeine was quantified in bivalves molluscs (exposure biomarker) and also in waters from mollusc's habitat (environmental contaminant), simultaneous with some effect biomarkers, mainly, acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO) and electrons transport system (ETS).

Caffeine quantification in bivalve molluscs and in marine waters was performed by high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detector (HPLC-UV) after samples pre-treatment by QuEChERS method (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) or solid phase extraction (SPE), respectively. This method was applied to the monitoring of both samples after optimization of the experimental conditions. Both results were confirmed by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

The limit of determination of QuEChERS-HPLC-UV method ($< 0.36 \mu\text{g/g}$) and SPE-HPLC-UV method (0.26 mg/L) were not enough for caffeine detection in bivalve molluscs and marine waters, respectively. Therefore, caffeine was quantified in both samples extracts by HPLC-MS/MS.

Caffeine concentrations in marine waters ranged from 18 ng/L (Alvor #1) to 83 ng/L (Olhão). Most bivalve molluscs (82%) showed caffeine with concentrations between 0.27 ng/g (mussels from Ludo) and 5.7 ng/g (razor clam from Alvor #1). The concentration of caffeine in water samples only represents a snapshot of its distribution at the sampling sites, while caffeine concentration in bivalve tissues represents their bioaccumulation time integrated over lifetime of individuals.

The protein content in bivalve molluscs ranged between 6% (cockles) and 11% (oysters). Fat content ranged from 0.6% (razor clam) to 2.1% (oyster). Mussel was the species with the highest mineral content (3.6%) and razor clam corresponded to the

species with the highest carbohydrate content (3.2%). The water content (humidity) ranged from 80% to 87%.

The average condition index (CI) ranged from 18% (oyster) to 68% (razor clam).

The effect biomarkers showed a discriminated response for different species: the clams from Olhão exhibited lowest AChE activity, Faro Beach mussels presented the highest LPO levels and the razor clam from Alvor #1 showed the highest ETS activity.

Overall, a positive correlation was observed between caffeine and CI and the results showed that higher robust individuals bioaccumulated higher caffeine concentrations in their tissues. However, caffeine alone did not show to be a stress factor and did not justify the variations in CI for the different bivalve molluscs. The average intra-specific CI values were higher for Ria Formosa bivalves. In Ria Formosa AChE and LPO levels were lower than Ria de Alvor but ETS levels were higher than Ria de Alvor.

Caffeine levels in marine waters and bivalve molluscs indicate that concentrations were not high enough to inhibit AChE. It was verified that larger individuals developed greater AChE activity, which leads to the conclusion that the increase of this biomarker may be exclusively due to the increase of their size. The correlation between caffeine and LPO and between CI and LPO was not significant. Regarding ETS activity, larger individuals, even with higher caffeine concentrations, also presented higher ETS activity, which may suggest that these individuals were under greater physiological stress.

The overall assessment of the three effect biomarkers may indicate that caffeine alone is not directly associated with the increased of oxidative stress of these organisms as well as stress be induced by other factors rather than caffeine, including other contaminants, environmental factors (temperature, oxygen and salinity) and/or biotic factors.

Keywords: bivalve molluscs, caffeine, biomarkers, Ria de Alvor, Ria Formosa.

Agradecimentos

Quero agradecer às duas Faculdades, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve, em particular às duas orientadoras desta tese, Professora Doutora Cristina Almeida e Professora Doutora Alexandra Cravo, a cooperação que possibilitou a realização desta tese de mestrado.

À Professora Doutora Cristina Almeida, quero agradecer o apoio, compreensão e paciência com que me ensinou e orientou no Laboratório de Bromatologia e Qualidade da Água, assim como, na escrita da tese. À Professora Doutora Alexandra Cravo, quero agradecer a disponibilidade para a colheita dos vários moluscos bivalves, assim como a realização das várias análises de caracterização ambiental do habitat dos moluscos bivalves. Obrigado por me esclarecer, corrigir e orientar nas várias correções do trabalho escrito.

Um agradecimento também às mestres Cátia Correia, Ana Flor Vidal e Micaela Justo da Universidade do Algarve pela ajuda na amostragem dos vários moluscos bivalves.

Estou muito grata aos meus colegas de laboratório, Sofia, Cristiana e Denis, pela força e incentivo demonstrados, assim como toda a paciência que tiveram para as minhas dúvidas, mesmo quando estavam ocupados com os seus próprios trabalhos.

Aos meus amigos, que não me deixaram desistir mesmo quando os obstáculos se acumulavam e a minha presença era cada vez menos regular.

À minha família, em especial aos meus pais e à minha avó, por sempre compreenderem a minha ausência e falta de tempo, sem nunca deixarem de me incentivar, encorajar e de acreditar em mim.

Índice

Resumo	I
Abstract	III
Agradecimentos	V
Índice	VII
Índice de Figuras.....	XIII
Índice de Tabelas	XV
Símbolos, siglas, acrónimos e abreviaturas	XVII
Introdução	1
Capítulo I - <i>Habitat</i> dos bivalves e aquacultura em Portugal	7
1. Algarve: zonas de produção de moluscos bivalves	7
1.1. Ria de Alvor	8
1.2. Ria Formosa.....	10
2. Produção e consumo de bivalves em Portugal.....	13
Capítulo II - Morfologia e caracterização nutricional dos bivalves	19
1. Morfologia	19
1.1. Bivalves em estudo	22
1.1.1. Amêijoia-boa (<i>Ruditapes decussatus</i>).....	24
1.1.2. Berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>)	25
1.1.3. Lambujinha (<i>Scrobicularia plana</i>)	26
1.1.4. Lingueirão (<i>Solen marginatus</i>)	27
1.1.5. Mexilhão (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	28
1.1.6. Ostra (<i>Crassostrea spp.</i>).....	30
2. Caracterização nutricional	31
Capítulo III- Biomarcadores de exposição ambiental versus biomarcadores de efeito....	35
1. Biomarcadores: conceitos gerais e classificação	35
1.1. Indicadores de exposição ambiental	37
1.1.1. Cafeína	42

1.1.1.1.	Caracterização química.....	42
1.1.1.2.	Presença da cafeína nas águas marinhas	43
1.1.1.3.	Toxicidade.....	46
1.2.	Biomarcadores de efeito.....	48
1.2.1.	Acetilcolinesterase	49
1.2.2.	Peroxidação lipídica	51
1.2.3.	Sistema de transporte de eletrões.....	53
Capítulo IV- Métodos analíticos		57
1.	Nota introdutória	57
2.	Quantificação da cafeína.....	57
3.	Biomarcadores de efeito.....	63
3.1.	Acetilcolinesterase (AChE)	65
3.2.	Peroxidação lipídica (LPO).....	69
3.3.	Sistema de transporte de eletrões (ETS).....	73
Capítulo V- Parte experimental		77
1.	Equipamento e material	77
1.1.	Equipamento	77
1.2.	Material.....	78
2.	Reagentes e soluções.....	79
2.1.	Reagentes gerais	79
2.2.	Soluções	81
2.2.1.	Caracterização nutricional	81
2.2.1.1.	Proteína	81
2.2.1.2.	Matéria gorda total	81
2.2.2.	Indicadores de contaminação – análise da cafeína	81
2.2.2.1.	Padrões de cafeína	81

2.2.2.2. <i>Surrogate</i> ou padrão interno de extração (5'-Hidroximetil-2'-furaldeído, HMF)	83
2.2.2.3. Soluções padrão de cafeína para o estudo de linearidade	83
2.2.2.4. Soluções padrão para a reta de calibração de cafeína.....	85
2.2.2.5. Soluções de controlo cromatográfico	87
2.2.2.6. Soluções padrão para a reta matriciada de cafeína.....	87
2.2.2.7. Soluções padrão para a reta de calibração <i>surrogate</i> (5'-hidroximetil-2'-furaldeído, HMF)	88
2.2.2.8. Fase móvel.....	88
2.2.3. Biomarcadores de efeito – análise de AChE, LPO e ETS	88
2.2.3.1. Acetilcolinesterase (AChE).....	88
2.2.3.2. Peroxidação lipídica (LPO)	89
2.2.3.3. Sistema de transporte de eletrões (ETS).....	91
3. Amostras de moluscos bivalves	91
4. Técnicas.....	92
4.1. Validação do método de HPLC-UV.....	92
4.1.1. Condições cromatográficas.....	92
4.1.2. Estudo da linearidade	93
4.1.3. Gama de trabalho	94
4.1.4. Estudo dos limiares analíticos.....	94
4.1.5. Estudo da precisão instrumental	95
4.1.6. Método de pré-tratamento da amostra, QuEChERS	95
4.1.7. Efeito de matriz.....	96
4.1.7.1. Curva de calibração do <i>surrogate</i> (HMF)	97
4.1.7.2. Reta matriciada da cafeína.....	98
4.1.8. Limiares analíticos do método global	98
4.2. Análise de fármacos nas amostras de águas marinhas	98

4.3.	Caracterização morfométrica	101
4.4.	Caracterização nutricional	102
4.4.1.	Controlo de qualidade interno.....	104
4.5.	Quantificação da cafeína.....	104
4.5.1.	Controlo de qualidade interno.....	106
4.6.	Biomarcadores de efeito	107
4.6.1.	Acetilcolinesterase (AChE)	107
4.6.2.	Peroxidação lipídica (LPO).....	109
4.6.3.	Sistema de transporte de eletrões (ETS)	111
4.7.	Análise estatística.....	112
Capítulo VI- Resultados e discussão.....		113
1.	Validação do método HPLC-UV	113
1.1.	Intervalo linearidade e gama de trabalho.....	113
1.2.	Estudo dos limiares analíticos	117
1.3.	Estudo da precisão instrumental	118
1.4.	Estudo da veracidade instrumental	118
1.5.	Efeito de matriz	119
1.5.1.	Método de adição de padrão (reta matriciada)	119
1.5.2.	Método de adição de <i>surrogate</i>	121
1.6.	Limiares analíticos do método global	121
1.7.	Controlo de qualidade interno.....	122
2.	Caracterização ambiental dos locais de amostragem	122
3.	Análise de cafeína em amostras de água por QuEChERS-HPLC-MS/MS	124
4.	Análise de moluscos bivalves.....	125
4.1.	Caracterização morfométrica	126
4.2.	Caracterização nutricional	132

4.2.1.	Teor de humidade.....	132
4.2.2.	Cinza.....	133
4.2.3.	Proteínas.....	135
4.2.4.	Matéria gorda total.....	136
4.2.5.	Hidratos de carbono	137
4.2.6.	Controlo de qualidade interno	138
5.	Quantificação da cafeína nas amostras por QuEChERS-HPLC-UV	139
6.	Análise de cafeína em amostras de bivalves por QuEChERS-HPLC-MS/MS..	139
7.	Biomarcadores de efeito	142
7.1.	Acetilcolinesterase (AChE)	142
7.2.	Peroxidação lipídica (LPO).....	148
7.3.	Sistema de transporte de eletrões (ETS)	151
Capítulo VII- Conclusões e perspectivas futuras		159
1.	Conclusões	159
2.	Perspetivas futuras	162
Referências bibliográficas		165

Índice de Figuras

Figura 1: Mapa de Portugal e da região do Algarve com indicação da interdição e não interdição da apanha de bivalves.	7
Figura 2: Ria de Alvor.	9
Figura 3: Mapa do Parque Natural da Ria Formosa.	12
Figura 4: Volume de produção de espécies marinhas em aquacultura em Portugal.	16
Figura 5: Produção mundial de produtos de pesca.	17
Figura 6: Produção nacional de produtos de pesca em 2016.	18
Figura 7: Morfologia interna dos moluscos bivalves.	20
Figura 8: Classificação dos biomarcadores.	37
Figura 9: Estrutura química da cafeína.	43
Figura 10: Processo de contaminação do ecossistema marinho.	45
Figura 11: Estrutura química da acetilcolinesterase (AChE).	49
Figura 12: Sistema de transporte de eletrões na mitocôndria.	55
Figura 13: Etapas do método QuEChERS para a análise da cafeína por HPLC-UV.	96
Figura 14: Determinação do comprimento, largura e espessura da amêijoia boa (<i>Ruditapes decussatus</i>) e a ostra (<i>Crassostrea spp.</i>).	101
Figura 15: Reta de calibração da cafeína por HPLC-UV no intervalo de concentrações entre os 5 µg/L e os 60 mg/L, CVm = 17,3%.	114
Figura 16: Intervalo de linearidade da gama baixa (GB) de concentrações da cafeína por HPLC-UV: (1) método dos mínimos quadrados, (2) análise de resíduos, (3) teste das áreas normalizadas, (4) teste de RIKILT e (5) teste de Mandel.	115
Figura 17: Correlação das áreas obtidas na análise da cafeína por HPLC-UV recorrendo a dois métodos de quantificação, método do padrão externo e reta matriciada. Análise de cinco níveis de concentração do intervalo linear (0,5 mg/L; 0,7 mg/L; 1,0 mg/L; 1,8 mg/L e 2,4 mg/L).	120
Figura 18: Índice de condição (a) e razão de massas casca/edível (b) de seis espécies de moluscos bivalves.	129
Figura 19: Índice de condição dos vários moluscos bivalves distribuídos pelos locais de amostragem.	130
Figura 20: Teor de humidade dos moluscos bivalves: amêijoia, berbigão, ligueirão, mexilhão e ostra.	132
Figura 21: Teor de cinza de vários moluscos bivalves: amêijoia, berbigão, ligueirão, mexilhão e ostra.	134
Figura 22: Teor de proteínas de vários moluscos bivalves: amêijoia, berbigão, ligueirão, mexilhão e ostra.	135
Figura 23: Teor de matéria gorda total de vários moluscos bivalves: amêijoia, berbigão, ligueirão, mexilhão e ostra.	136

Figura 24: Teor de hidratos de carbono de vários moluscos bivalves: amêijoia, berbigão, ligueirão, mexilhão e ostra.....	137
Figura 25: Atividade da acetilcolinesterase (AChE) por espécie (a) e por local de amostragem (b) dos moluscos bivalves em estudo.....	143
Figura 26: Peroxidação lipídica (LPO) por espécie (a) e por local de amostragem (b) dos moluscos bivalves em estudo.	148
Figura 27: Atividade do sistema de transporte de eletrões (ETS) por espécie (a) e por local de amostragem (b) dos moluscos bivalves em estudo.....	152
Figura 28: Análise de componentes principais (PCA), PC1 vs PC2.....	156
Figura 29: Análise de componentes principais (PCA), PC1 vs PC3.....	157

Índice de Tabelas

Tabela 1: Sistema de classificação das zonas de apanha de moluscos bivalves.	15
Tabela 2: Taxonomia dos moluscos bivalves.....	23
Tabela 3: Composição bioquímica dos bivalves.	34
Tabela 4: Sumário das metodologias de análise da cafeína em várias matrizes ambientais e alimentares.	63
Tabela 5: Sumário de vários estudos realizados para a determinação da atividade da AChE.....	68
Tabela 6: Sumário de vários estudos realizados para a determinação da LPO.	72
Tabela 7: Sumário de vários estudos realizados para a determinação da atividade da ETS.	76
Tabela 8: Preparação das soluções padrão de cafeína para o estudo da linearidade.	84
Tabela 9: Preparação das soluções padrão de cafeína para a curva de calibração nas três gamas de trabalho.	86
Tabela 10: Preparação das soluções de cafeína para a reta matriciada.	87
Tabela 11: Preparação das soluções padrão de HMF para a curva de calibração.	88
Tabela 12: Condições cromatográficas para a determinação da cafeína por HPLC-UV.	93
Tabela 13: Condições de SPE e de secagem no Turbovap.	99
Tabela 14: Limiares analíticos e as gamas de trabalho dos fármacos em águas marinhas analisados por SPE-HPLC-MS/MS (método interno).	100
Tabela 15: Preparação dos padrões para a curva de calibração, absorvência <i>versus</i> concentração de MDA (μM).	110
Tabela 16: Estudo do intervalo linear e gama de trabalho da cafeína por HPLC-UV.....	116
Tabela 17: Limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método HPLC-UV para a análise da cafeína por HPLC-UV. Limites determinados com base na reta de calibração linear e em ensaios de repetibilidade.....	117
Tabela 18: Estudo da precisão instrumental em condições de repetibilidade.	118
Tabela 19: Estudo do intervalo linear da cafeína por HPLC-UV.	120
Tabela 20: Pontos de amostragem das águas marinhas e caracterização físico-química das mesmas (ensaios <i>in situ</i>).....	123
Tabela 21: Fármacos e hormonas detetados nas águas marinhas em vários locais de amostragem e analisados por HPLC-MS/MS.	125
Tabela 22: Caracterização morfométrica dos moluscos bivalves em estudo: massa, comprimento, largura e espessura.....	127
Tabela 23: Data de amostragem dos moluscos bivalves e número de indivíduos por ponto de amostragem.....	128

Tabela 24: Análise de duplicados e ensaios de recuperação efetuados no decorrer do controlo de qualidade interno nas várias séries de trabalho.139

Tabela 25: Fármacos detetados nos moluscos bivalves dos locais de amostragem através do método HPLC-MS/MS.140

Símbolos, siglas, acrónimos e abreviaturas

a	Ordenada na origem (equação da reta $y = a + bx$)
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina difosfato
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemist</i> , associação oficial de químicos analíticos
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i> , extração acelerada por solvente
ATP	Adenosina Trifosfato
b	Declive da reta (equação da reta $y = a + bx$)
BuChE	Butirilcolinesterase
CAF	Cafeína
CBZ	Carbamazepina
CEC	<i>Contaminants of Emerging Concern</i> , contaminantes de interesse emergente
CHP	<i>Cumene Hydroperoxide</i> , hidroperóxido de cumeno
CI	<i>Condition Index</i> , índice de condição
CV _m	Coeficiente de Variação do Método
DD	Diferença de Duplicados
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)
dw	<i>Dry Weight</i> , peso seco
ED	<i>Endocrine Disruptors</i> , desreguladores endócrinos
EM	Efluentes Municipais
EPAL	Empresa Portuguesa das Águas Livres
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ETS	<i>Electron Transport System</i> , sistema de transporte de eletrões
EU	<i>European Union</i> , união europeia
F	Valor tabelado da distribuição F de Fisher/Snedecor
F _c	Fator de Concentração
FFUL	Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
FR	Fator de Resposta

GA	Gama Alta
GB	Gama Baixa
GC	<i>Gas Chromatography</i> , cromatografia gasosa
GD	Glândula Digestiva
GIm	Gama Intermédia
GrEI	Gradiente de Eluição
GT	Gama Total
HF-LPME	<i>Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction</i> , microextração em fase líquida com fibras ocas
HMF	5'-Hidrometil-2'-furaldeído
HPLC-UV	<i>High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detetor</i> , cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetor UV-Vis
ICNB	Instituto de Conservação da Natureza e da Biodiversidade
INRB	Instituto Nacional dos Recursos Biológicos
IPMA	Instituto Português do Mar e da Atmosfera
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
LC-MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i> , cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LD	Limite de Detecção (instrumental)
LLE	<i>Liquid-Liquid Extration</i> , extração líquido-líquido
LPO	<i>Lipid Peroxidation</i> , peroxidação lipídica
LQ	Limite de Quantificação (instrumental)
MAME	<i>Microwave-Assisted Micellar Extraction</i> , extração micelar assistida por micro-ondas
MDA	Malonaldeído bis(dimetil acetal)
MDL	<i>Method Detection Limit</i> , limite de deteção do método global
MQL	<i>Method Quantification Limit</i> , limite de quantificação do método global
MS	<i>Mass Spectrometry</i> , espectrometria de massas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> , espectrometria de massa <i>tandem</i>
N	Número de pontos experimentais da reta de calibração
n	Número de ensaios
NP	Norma Portuguesa
n.a	não aplicável
OCP	<i>Organochlorine Pesticides</i> , pesticidas organoclorados
p.a.	Pró-Análise

PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i> , hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> , análise de componentes principais
PCB	<i>Polychlorinated Biphenyl</i> , bifenilos policlorados
PCDF	<i>Polychlorinated Dibenzofurans</i> , dibenzofuranos policlorados
Ph Eur	<i>European Pharmacopeia</i> , farmacopeia europeia
pK_a	Constante de acidez
PLE	<i>Pressurized Liquid Extration</i> , extração com líquido pressurizado
PPCP	<i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i> , produtos de cuidado pessoal e farmacêutico
PSA	<i>Primary/ Secondary Amine</i> , amina primária/ secundária
PUFA	<i>Polyunsaturated Poly Acids</i> , ácidos gordos polinsaturados
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> , rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro
R	Coeficiente de correlação da reta
R^2	Coeficiente de determinação da reta
Rec	Recuperação
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , espécies reativas de oxigénio
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual de uma função linear
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extration</i> , extração sortiva em barra de agitação
SDME	<i>Single Drop Microextraction</i> , microextração em gota suspensa
SDH	<i>Succinato Dehydrogenase</i> , succinato desidrogenase
SIC	Sítio de Importância Comunitária
SNMB	Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves
SPE	<i>Solid Phase Extration</i> , extração em fase sólida
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> , microextração em fase sólida
TBA	<i>Thiobarbituric Acid</i> , ácido tiobarbitúrico
TO	Totalidade do Organismo
UFC	Unidades Formadores de Colónias
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> , cromatografia líquida de ultra eficiência
VT	Valor Teste para o estudo de funções lineares
ww	<i>Wet Weight</i> , peso fresco

Introdução

Os ambientes marinhos são alvo da descarga de vários tipos de poluentes associados às atividades antropogénicas que, por sua vez, acumulam uma grande diversidade de compostos, como metais e compostos orgânicos persistentes. Recentemente, o foco de preocupação por parte da comunidade científica está relacionado com a propagação de vários compostos de interesse emergente, nomeadamente fármacos, nos meios aquáticos, causando a destruição e alteração da biota desses habitats. As principais fontes de contaminação das águas superficiais são os efluentes das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), escorrência agrícola e os efluentes das pecuárias e da aquacultura. Ao longo dos anos, verificou-se, um aumento contínuo na frequência de deteção e na sua concentração nas águas, atingindo valores na ordem dos ng/L (1–4).

A cafeína é um dos compostos usualmente presentes nos estudos de ocorrência ambiental (águas doces ou salgadas) e, por isso, um bom indicador de contaminação antropogénica. Encontra-se distribuída mundialmente e é considerada um composto pseudo-persistente, uma vez que, apesar de degradável, não se consegue eliminar do ecossistema marinho devido à sua contínua descarga no ambiente. É caracterizada como um estimulante psicoativo devido à sua interação com o sistema nervoso central. A cafeína entra na dieta de grande parte das populações através da ingestão de alimentos como café, chás ou como um ingrediente ativo de alguns fármacos. Segundo Capolupo *et. al* (2016), 3% da cafeína ingerida pelo Homem é excretada intacta, idêntica à que foi ingerida, e atinge assim as águas municipais sendo que, posteriormente, estas serão libertadas no meio aquático. No entanto, ao contrário do que acontece com outros fármacos e/ou contaminantes, a taxa de degradação da cafeína é elevada (3,5–9).

A crescente contaminação do meio aquático marinho fez com que se desenvolvessem vários métodos analíticos de pré-tratamento e análise, adaptados aos vários tipos de contaminantes, de modo a avaliar o seu impacto nos ecossistemas. Com este objetivo também são monitorizadas várias espécies marinhas, nomeadamente moluscos bivalves. Geralmente, os tecidos dos moluscos são homogeneizados e conservados refrigerados ou congelados em nitrogénio líquido, no caso de a análise das amostras se realizar num curto ou longo espaço de tempo, respetivamente. A extração e

concentração dos compostos alvo pode ser realizada por vários métodos, como a extração líquido-líquido (LLE), a extração sólido-líquido (extração por Soxhlet), a extração em fase sólida (SPE), ou com recurso ao QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method) (4–7,10–16). Após a extração e concentração do(s) composto(s) alvo das amostras de moluscos bivalves, procede-se à quantificação dos compostos, neste caso particular, da cafeína. A deteção e quantificação de fármacos e outros poluentes presentes em diversas matrizes ambientais, incluindo matrizes alimentares, são determinadas, na sua maioria, através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pode estar associada a vários tipos de detetores, como o detetor de ultra-violeta (UV), o detetor de arranjo de díodos (DAD), associado à espectrometria de massa de quadrupolo simples (MS) ou de triplo quadrupolo (MS/MS). Os mais utilizados em HPLC são os detetores UV-Vis e a espectrometria de massa *tandem* (MS-MS) (17).

No entanto, a análise química revelou-se insuficiente para avaliar o impacto dos contaminantes nas águas e na biota local dado que, muitas vezes, os contaminantes aparecem associados a misturas complexas. Assim, a medição dos efeitos biológicos dos poluentes, denominados como biomarcadores, são fulcrais para a estimar a qualidade do ambiente marinho (4,18).

A cafeína, devido à sua relação com a atividade antropogénica, é utilizada como indicador de contaminação das águas superficiais. O uso de biomarcadores para detetar a presença de poluentes tem sido crucial para o estudo dos efeitos adversos causados no habitat marinho, nomeadamente na biota local, uma vez que fornece respostas acerca da integridade dos organismos expostos a compostos tóxicos. Os biomarcadores de efeito indicam alterações que possam ter ocorrido no organismo a nível molecular, celular ou fisiológico como resposta à exposição a contaminantes. A inibição da acetilcolinesterase (AChE) é muito utilizada na avaliação fisiológica de vários organismos. Esta enzima é considerada um biomarcador de efeito, uma vez que a sua atividade é inibida pela ação de certos tóxicos como os compostos organofosforados. Outros parâmetros que são tidos em conta como biomarcadores de efeito são o *stress* oxidativo ou as alterações genotóxicas. Os biomarcadores mais frequentemente utilizados são os produzidos pela indução enzimática do citocromo P4501A, a atividade da acetilcolinesterase (AChE), a integridade do ácido desoxirribonucleico (ADN), a atividade do sistema de transporte de

eletrões (ETS), as metalotioneínas (proteínas) e a peroxidação lipídica (LPO) (2,4,5,7,19,20). A cafeína e outros contaminantes, como resíduos de pesticidas, metais pesados ou compostos orgânicos persistentes podem ser considerados biomarcadores de exposição ambiental (2,4,5).

Os moluscos bivalves são uma espécie marinha com distribuição mundial, sendo extremamente sensíveis a fatores de *stress* (variação do nível das águas, alterações climáticas...) e capazes de acumular e concentrar xenobióticos presentes no ambiente. Estes organismos são filtradores e, conseqüentemente, apresentam uma grande interação com a água e com os sedimentos, filtrando elevados volumes de água para a sua alimentação e respiração. Devido às suas características, estes organismos são bons indicadores de contaminação marinha. (2,3,5,14,21).

Portugal é um grande produtor e consumidor de bivalves e, por isso, estas são atividades com impacto na economia nacional. Os bivalves estão muito presentes na dieta dos portugueses e são de elevada importância do ponto de vista nutricional, por serem ricos em nutrientes essenciais, nomeadamente, ácidos gordos polinsaturados, aminoácidos essenciais e uma boa fonte em vitaminas A e D, assim como em minerais. A composição bioquímica pode variar inter ou intra-espécie devido a vários fatores como a localização geográfica ou os fatores genéticos. Porém, os benefícios do seu consumo poderão ser questionados em função da sua potencial contaminação decorrente da exposição destes organismos a substâncias poluentes, que se podem acumular nas partes edíveis. Assim, o consumo destes organismos pode representar uma ameaça à qualidade e inocuidade do alimento devido à exposição ambiental a vários contaminantes. Os moluscos bivalves são consumidos mundialmente em grande escala e a grande preocupação está relacionada com a segurança dos alimentos adjacente ao seu consumo (13,22–24).

Face ao exposto, é de extrema importância monitorizar a qualidade dos ecossistemas marinhos adjacentes ao habitat dos moluscos bivalves, bem como a parte edível de diversos moluscos bivalves. Neste contexto, este estudo teve por objetivo quantificar a cafeína nas águas marinhas da Ria Formosa e Ria de Alvor (potencial contaminante ambiental) e em várias espécies de moluscos bivalves no seu habitat natural (amêijoia - *Ruditapes decussatus*, berbigão - *Cerastoderma edule*, lambujinha - *Scrobicularia plana*,

lingueirão - *Solen marginatus*, mexilhão - *Mytilus galloprovincialis*, ostra - *Crassostrea spp.*), cujos resultados foram correlacionados com três biomarcadores de efeito (AChE, LPO, ETS), vários parâmetros nutricionais (água, proteína, matéria gorda, hidratos de carbono e minerais) e dados morfométricos (massa, tamanho e índice de condição), os quais foram determinados em paralelo.

Para uma melhor compreensão do trabalho desenvolvido, este foi organizado por capítulos, que definem várias secções relativas às duas grandes áreas desta tese de mestrado: teórica e experimental. Da área teórica fazem parte os primeiros 4 capítulos:

O capítulo I apresenta uma breve caracterização da região em estudo, a região algarvia, nomeadamente a Ria Formosa e a Ria de Alvor. Este capítulo também faz uma abordagem o papel dos moluscos bivalves na alimentação dos portugueses assim como alguns dados estatísticos de produção, consumo, importação e exportação de bivalves.

O capítulo II está centrado na morfologia dos moluscos bivalves em estudo: amêijoabo, berbigão, lambujinha, lingueirão, mexilhão e ostra. Cada uma destas espécies é caracterizada segundo a sua morfologia externa e interna, *habitat* e hábitos alimentares. Este também apresenta de forma resumida o valor nutricional dos moluscos bivalves.

No capítulo III define-se o conceito geral de biomarcador e as suas classificações. Este capítulo está dividido em dois grandes tópicos: a cafeína como biomarcador de exposição ambiental e a acetilcolinesterase, peroxidação lipídica e sistema de transporte de eletrões como biomarcadores de efeito.

O capítulo IV é responsável por uma descrição sumária dos vários métodos utilizados na análise de cafeína e para a determinação dos três biomarcadores em estudo (AChE, LPO e ETS).

A secção experimental está organizada em três capítulos, V, VI e VII.

No capítulo V descreve-se a metodologia utilizada para o desenvolvimento do trabalho experimental. Este capítulo aborda normas ou metodologias seguidas, nomeadamente para a caracterização nutricional e para a determinação dos biomarcadores. Ainda neste secção é descrito detalhadamente o método de validação da cafeína por HPLC-UV.

No capítulo VI são apresentados e discutidos os resultados obtidos na validação do método de análise por HPLC-UV e na análise das amostras dos bivalves em estudo assim como das águas marinhas adjacentes.

O capítulo VII resume as principais conclusões do trabalho realizado e propõe alguns trabalhos a desenvolver no futuro, para uma melhor compreensão do impacto dos contaminantes nos moluscos bivalves e a sua resposta aos vários tipos de fatores de *stress*.

Capítulo I - *Habitat* dos bivalves e aquacultura em Portugal

1. Algarve: zonas de produção de moluscos bivalves

O Algarve é caracterizado por uma grande diversidade paisagística e geológica, de grande interesse económico, turístico e conservacionista, com uma grande riqueza de biodiversidade terrestre e marinha (25).

A Figura 1 ilustra esta região, situada a sul de Portugal, com uma área de cerca de 4 900 km². Esta área é constituída por 16 conselhos e divide-se, em termos geológicos e morfológicos, em três grandes áreas: litoral, serra e barrocal. A primeira é caracterizada por rochas sedimentares, paisagens diversificadas e local de abrigo de espécies endémicas e protegidas. A segunda área ocupa aproximadamente metade do território algarvio, albergando três serras: serra de Espinhaço de Cão, serra de Monchique e serra do Caldeirão. Apresenta predominância de rochas xistosas, albergando uma menor diversidade biológica e paisagística. A terceira área, o barrocal, é a zona intermédia entre o litoral e as serras. A diversidade da fauna e os solos calcários de elevada qualidade agrícola são características específicas deste local. Esta zona também apresenta os principais sistemas aquíferos do Algarve (25).

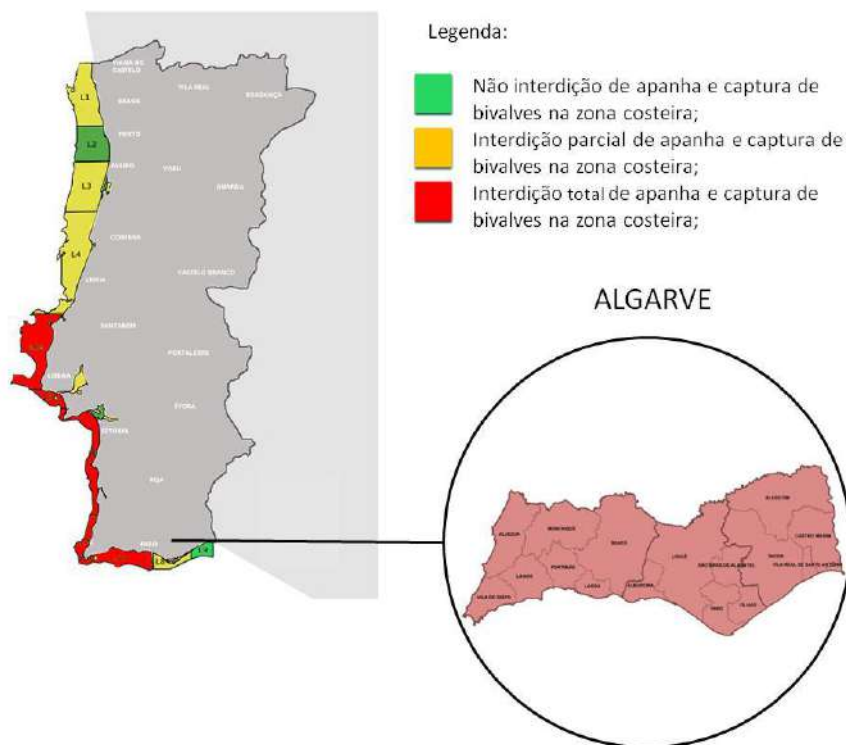


Figura 1: Mapa de Portugal e da região do Algarve com indicação da interdição e não interdição da apanha de bivalves (Fonte: Adaptado de IPMA, <http://www.ipma.pt/pt/bivalves/index.jsp>).

Na zona costeira do algarve existem vários sistemas de elevada importância tais como lagoas costeiras e estuários. Os recursos hídricos do Algarve albergam ecossistemas com inúmeras espécies de importância ecológica, endemismos e espécies ameaçadas. Dos principais aquíferos e bacias hidrográficas são de realçar o sistema aquífero de Covões, o aquífero aluvionar de Aljezur, e as ribeiras de Seixe, Aljezur e Bordeira. Os estuários são considerados Sítios de Importância Comunitária (SIC) e, portanto, locais protegidos e de conservação faunística e florística. Entre os principais estuários encontram-se a Ria de Alvor (25). A Ria Formosa, é um sistema lagunar de elevada relevância ecológica, sendo considerado o maior produtor de bivalves do país, onde a presença de água doce só é importante em Tavira onde desagua o rio Gilão. Embora em menor escala, esta atividade também é praticada na Ria do Alvor (26–29).

Os sistemas estuarinos e lagunares são classificados como um dos ambientes de maior interesse na Terra, quer sob o ponto de vista ecológico, quer económico, com elevada suscetibilidade às atividades antropogénicas. Estes sistemas são muito produtivos e dinâmicos, apresentando um valor económico elevado. Este trabalho está direcionado para esta região do país de onde foram recolhidos bivalves na zona costeira da Ria de Alvor e da Ria Formosa aqui localizados e porque a grande maioria dos viveiristas associados à produção de moluscos bivalves estão nesta zona (26–29).

1.1. Ria de Alvor

A Ria de Alvor é um sistema lagunar-estuarino, situado entre as cidades de Lagos e Portimão, com uma extensão de cerca de 15 km para o interior e 1,5 km em largura (Figura 2) (28,30). Está situada na baía de Lagos (37°08.22'N, 8°36.43'W) e neste sistema vão desaguar quatro ribeiras nascidas na serra de Monchique (ribeiras de Odiáxere, Arão, Farelo e Torre) caracterizadas por eventos sazonais e torrenciais, embora sequem completamente nos meses de Verão. A península central é denominada de Quinta da Rocha e é responsável pela forma em “U” do sistema lagunar (31–33).

A área total da Ria do Alvor é de 1454 ha, sendo constituído por sapais, bancos arenosos, salinas, duas penínsulas e zonas intertidais (zonas entre marés). O sistema lagunar da Ria de Alvor é limitada pelas penínsulas de bancos de areia - Rocha e Abicada - interrompidos por uma entrada artificial que mantém as trocas e comunicação entre o oceano e a Ria (31,32,34).

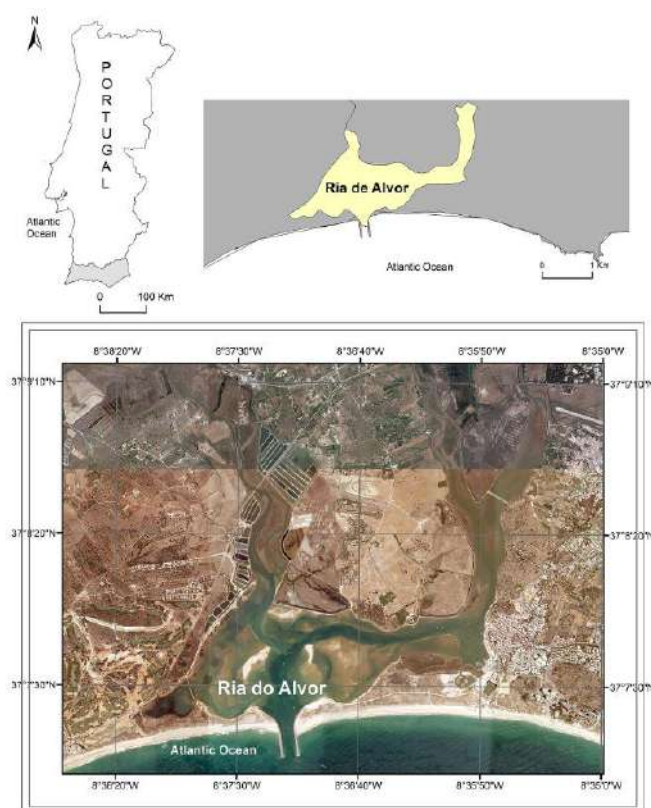


Figura 2: Ria de Alvor (Fonte: Mateus *et al.* 2016 (32)).

As marés são semi-diurnas com as marés vivas a atingirem uma média de 2,85 m. Durante a baixa-mar praticamente toda a área da Ria encontra-se emersa. Consequentemente há uma renovação quase total da água a cada maré, resultando também desse processo as fortes correntes (31,32).

Como dito anteriormente, a biodiversidade observada na Ria de Alvor inclui o crescimento e desenvolvimento de várias espécies marinhas, como peixes e moluscos bivalves. As pequenas variações nos ecossistemas, devido possivelmente a alterações climáticas e/ou pressões antropogénicas ao longo do ano, podem ter impacto nas espécies ali inseridas. Devido à sua pequena dimensão, a Ria de Alvor é classificada como um sistema lagunar-estuarino pequeno e por isso, merece um cuidado redobrado relativo à poluição e contaminação deste recurso hídrico, uma vez que qualquer perturbação, por mais pequena que seja, tem maior impacto no ecossistema. Os bivalves, por serem espécies filtradoras, são mais sensíveis a ligeiras alterações dos parâmetros físicos do meio, assimilando grande parte dos compostos presentes nos ambientes onde estão inseridos. Por isso, a contaminação das águas e, consequentemente, dos moluscos

bivalves é uma preocupação a nível mundial e tem sido reconhecido como um problema de saúde pública (28,30–32).

Na Ria de Alvor há duas atividades predominantes relacionadas com a produção e apanha de moluscos bivalves, nomeadamente a apanha indiscriminada dos bivalves que crescem naturalmente naqueles locais, com o intuito de venda em pequenos mercados ou para consumo próprio, ou a cultura de espécies em viveiros, como as amêijoas e as ostras, para posterior comercialização (31).

A Ria de Alvor tem elevado valor científico, patrimonial e ecológico uma vez que acolhe inúmeras espécies de peixes e aves, bem como uma grande variedade de vegetação. A pesca de peixe e bivalves, o desenvolvimento industrial e turístico e a agricultura local são as principais fontes de contaminação da Ria, provocando danos nefastos no ambiente marinho. Consequentemente é de extrema importância encontrar medidas de conservação que vão ao encontro aos interesses socioeconómicos da região. Este local foi classificado como uma zona húmida de importância internacional na convenção de RAMSAR (Convenção das zonas húmidas com interesse internacional para as aves aquáticas) e Sítio de Importância Comunitária (SIC) pela Rede Natura 2000 (32–35).

1.2. Ria Formosa

A Ria Formosa, por vezes conhecida como Ria de Faro, similarmente à Ria de Alvor, é um sistema lagunar-estuarino no sul de Portugal que faz parte do Parque Natural da Ria Formosa. Está localizada no distrito de Faro (37°01'N; 07°49'W) e abrange os concelhos de Loulé, Faro, Tavira, Olhão e Vila Real de Santo António (Figura 3). Em 2004, foi considerada, pela ICNB (Instituto de Conservação da Natureza e da Biodiversidade) como a área húmida mais importante do sul de Portugal, com grande diversidade de habitats, fauna e flora. É considerada uma das zonas húmidas mais importantes para as aves migratórias, albergando cerca de 20000 espécies de aves aquáticas. Tem uma configuração triangular, formada por duas penínsulas - Ancão e Cacela- uma faixa terrestre e um cordão litoral paralelo à orla costeira constituído por várias ilhas barreira responsáveis pela separação da Ria e do Oceano Atlântico e, consequentemente, pela ação direta do mar aberto na costa. A Ria tem uma extensão de cerca de 55 km (oeste-este). Das ilhas barreira fazem parte as ilhas da Barreta, Culatra, Armona, Tavira e

Cabanas que se encontram separadas por seis barras (Ancão, Faro-Olhão, Armona, Fuzeta, Tavira e Lacém) que facilitam as trocas de águas lagunares e oceânicas (36–43).

O sistema Lagunar tem em média 2 m de profundidade, com fundos irregulares. Ocupa cerca de 23000 ha, sendo que 3432 ha correspondem a sapais e 945 ha a salinas. Uma pequena parte ainda é ocupada por pinhais e dunas (42). Devido às marés vivas, 80% da área lagunar pode encontrar-se submersa durante a preia-mar, emergindo na baixa-mar. Apenas cerca de 14% da área total se encontra permanentemente submersa. Há uma constante ligação com o oceano, sendo a Ria Formosa constituída maioritariamente por águas do mar que entra no sistema através das suas barras. A proveniência da água doce deve-se aos cursos de água dos rios, ribeiras e riachos que desaguam no sistema lagunar. Contudo, estes eventos são sazonais e torrenciais, com exceção do rio Gilão. Dada a fraca importância da água doce neste sistema, não é considerado um verdadeiro estuário. Os sapais são inundados duas vezes por dia, no decorrer da enchente da maré, que troca nutrientes e oxigénio das águas oceânicas para o sistema lagunar (36,42,44).

Segundo Costa *et al* (1996), este local abriga lençóis freáticos que, no Inverno, chegam a atingir a superfície, seguido de um contínuo aumento da sua profundidade até aos meses de Agosto ou Setembro, onde voltam a encher com o aumento da precipitação e consequentemente diminuem a sua profundidade. O fluxo do lençol freático também aumenta com a preia-mar. A precipitação e as marés são fatores importantes na ocorrência das variações bruscas dos lençóis freáticos da Ria Formosa. Relativamente à salinidade, esta aumenta com a diminuição do fluxo do lençol freático, sendo por isso maior nos meses de Verão. A infiltração da água da chuva, se intensa, provoca uma diminuição brusca da salinidade (42).

O clima deste local é caracteristicamente mediterrânico, com uma estação quente e seca durante os meses de Verão e uma estação amena e com pouca precipitação nos meses de Inverno. A temperatura média ronda os 17 °C e a insolação é elevada. As marés são semidiurnas, atingindo uma média de 2,8 m durante as marés vivas e 1,3 m nas marés mortas (36,37,41).

Nas últimas décadas observou-se um movimento das ilhas barreira em direção a terra, devido aos ventos de elevada velocidade e agitação marítima. As zonas intertidais da Ria

Formosa, habitat de inúmeros moluscos bivalves, são caracterizadas por constantes desequilíbrios químicos dos sedimentos superficiais e da água. Quando a maré vaza, a superfície do substrato fica em contacto direto com a atmosfera que desencadeia uma série de reações químicas, como o aumento da fotossíntese e reações fotoquímicas, e promove um aumento de temperatura do sedimento superficial. Como consequência, quando o nível do mar volta a subir são instaladas novas condições no ecossistema marinho (37,38).

A Ria Formosa acolhe uma enorme biodiversidade, não só a fauna e flora marinha mas também inúmeras espécies de aves migratórias. Devido à sua beleza natural, a Ria Formosa tornou-se um ponto de atração turística em Portugal e, consequentemente, de interesse económico. Devido à sobre-exploração e devastação do património cultural com a implementação de atividades de lazer e turísticas, como a pesca intensiva e a construção de habitações, foi necessário criar um estatuto que protegesse a área algarvia. Foi criado o Parque Natural da Ria Formosa com o objetivo de proteger e conservar o sistema lagunar, bem como a fauna e flora local (39,42,45).



Figura 3: Mapa do Parque Natural da Ria Formosa (Fonte: ICNF, <http://www.icnf.pt/portal/ap/resource/img/pnrf/mapas/map>).

Este complexo sistema lagunar é responsável por cerca de 80% da produção nacional de moluscos bivalves. Contudo, devido à sua localização e características únicas adquiridas pelas ilhas-barreira, esta região está sujeita a constante agitação marítima, ventos, mudanças das marés, erosão e suscetibilidade a tempestades. Estes fatores vão influenciar as condições e parâmetros físicos das águas que, por sua vez, vão influenciar as espécies dos ecossistemas marinhos, em particular a dos moluscos bivalves, espécies extremamente sensíveis a estas variações. Assim, o desenvolvimento, crescimento populacional e distribuição destas espécies pode variar ao longo do tempo (37,38,41,42).

2. Produção e consumo de bivalves em Portugal

Os moluscos bivalves são uma fonte de alimentação e rendimento para milhões de pessoas no mundo, em particular em países litorais costeiros e com sistemas lagunares e estuarinos, habitats de eleição dos bivalves. Portugal é um grande produtor e consumidor de bivalves e, por isso, a alteração na qualidade destes recursos tem elevado impacto na economia nacional. Os bivalves estão muito presentes na dieta dos portugueses e são de elevada importância do ponto de vista nutricional (13,46,47).

Tendo em conta as regiões de crescimento e desenvolvimento dos bivalves e as condições ambientais de Portugal, como estuários e zonas lagunares, as populações destes organismos têm vindo a diminuir devido à sobre-exploração dos mesmos ambientes. Assim, foi necessária a produção artificial de bivalves para corresponder à procura constante e à quantidade consumida *per capita*. A aquacultura em Portugal é uma prática antiga, embora só em meados dos anos 80 se verificasse um crescimento e desenvolvimento gradual desta indústria, trazendo vantagens socioeconómicas para o país (29,46,48). Desde 1985 que a produção global de pescado em aquacultura tem um crescimento constante, prevendo-se a continuação desse crescimento ao longo dos próximos anos. Entre 1991 e 2000, verificou-se um crescimento exponencial na produção mundial de moluscos bivalves, passando de 6,3 para 14,3 milhões de toneladas (47,49).

Devido ao risco de contaminação destes organismos e de modo a garantir a segurança e salubridade dos mesmos para o consumo humano, foi criado um plano de monitorização e controlo da qualidade dos ecossistemas onde os moluscos bivalves se

inserem, o sistema nacional de monitorização de moluscos bivalves (SNMB). Em Portugal, as entidades responsáveis por este controlo são o Instituto Nacional dos Recursos Biológicos (INRB) e o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). Este último faz avaliações regulares da qualidade das águas marinhas e dos sistemas lagunares e estuarinos que determinam se os parâmetros avaliados estão dentro dos limites legislados, e se os bivalves inseridos nesses ambientes podem ser produzidos, comercializados e consumidos. Alguns dos parâmetros monitorizados são microrganismos (controlo microbiológico), o despiste de fitoplâncton tóxico, a quantificação dos níveis de biotoxinas marinhas e os metais pesados (50,51).

Segundo o Regulamento (EC) Nº 854/2004, as zonas de produção de moluscos bivalves são classificadas, pelas autoridades competentes, como zonas com permissão ou proibição da apanha e consumo destas espécies. À Classe A pertencem “as zonas onde os moluscos bivalves podem ser colhidos para consumo humano direto”. A Classe B engloba as zonas onde é permitida a apanha de moluscos bivalves para consumo humano “após tratamento num centro de depuração ou após afinação”. As zonas que pertencem à Classe C são “zonas onde os moluscos bivalves podem ser colhidos, mas só podem ser colocados no mercado para consumo humano após afinação durante um longo período”. Se a zona não estiver compreendida entre nenhuma das classes acima descritas, a captura de bivalves fica interdita e está proibida a sua comercialização e consumo. A depuração é um processo de limpeza dos moluscos bivalves através da sua capacidade de filtração da água. Os indivíduos são transferidos do local onde foram colhidos para tanques que contêm água salgada filtrada e esterilizada, em que fatores abióticos, como a temperatura, salinidade e oxigenação da água, são controlados. Assim, maior parte dos contaminantes e pequenos detritos que poderão estar retidos nas brânquias, manto ou glândula digestiva dos organismos são libertados para a água (46,52).

A Tabela 1 apresenta os níveis permitidos de *Escherichia coli* nos moluscos bivalves, expressos em unidades formadoras de colónias (UFC), consoante o tipo de classe das respetivas zonas de produção.

Tabela 1: Sistema de classificação das zonas de apanha de moluscos bivalves (52).

Classe	Teor de <i>Echerichia coli</i> (UFC)/ 100 g parte edível
A	<230
B	>230, ≤4600
C	>4600, ≤46000
Proibida	≥46000

Os moluscos bivalves são produzidos mundialmente em aquacultura ou capturados nos seus ambientes naturais. Atualmente, a produção de bivalves em Portugal é, essencialmente, sob regime extensivo. Os moluscos bivalves que crescem no meio naturalmente são capturados em bancos de areia nos estuários, lagoas ou ao longo da orla costeira. Numa perspetiva generalista, entre os anos 1990 a 1997 a aquacultura cresceu cerca de 27%, sendo que as zonas mais exploradas para esta prática foram Aveiro, Figueira da Foz, Vale do Tejo, Setúbal e Algarve (13,46,53–56). Portugal é um grande produtor de pescado, especificamente de moluscos que representam cerca de metade dessa produção (48%). Entre os moluscos, os mais produzidos e comercializados são os bivalves, nomeadamente amêijoas, seguidas dos mexilhões e das ostras (Figura 4). A amêijoia europeia *Ruditapes decussatus* produzida na Ria Formosa representa cerca de 90% da produção nacional desta espécie. Devido ao consumo *per capita* da população portuguesa ser elevado, a produção interna não é suficiente recorrendo-se à importação de bivalves para satisfazer a elevada procura nacional de marisco. Em 2009, Portugal foi classificado como o maior consumidor anual de produtos marinhos da União Europeia (54,2 kg/capita), dos quais os bivalves estavam bem representados (2,5 kg/capita). Atualmente ocupa também a terceira posição dos países com maior consumo mundial de produtos de pesca (29,40,48,57).

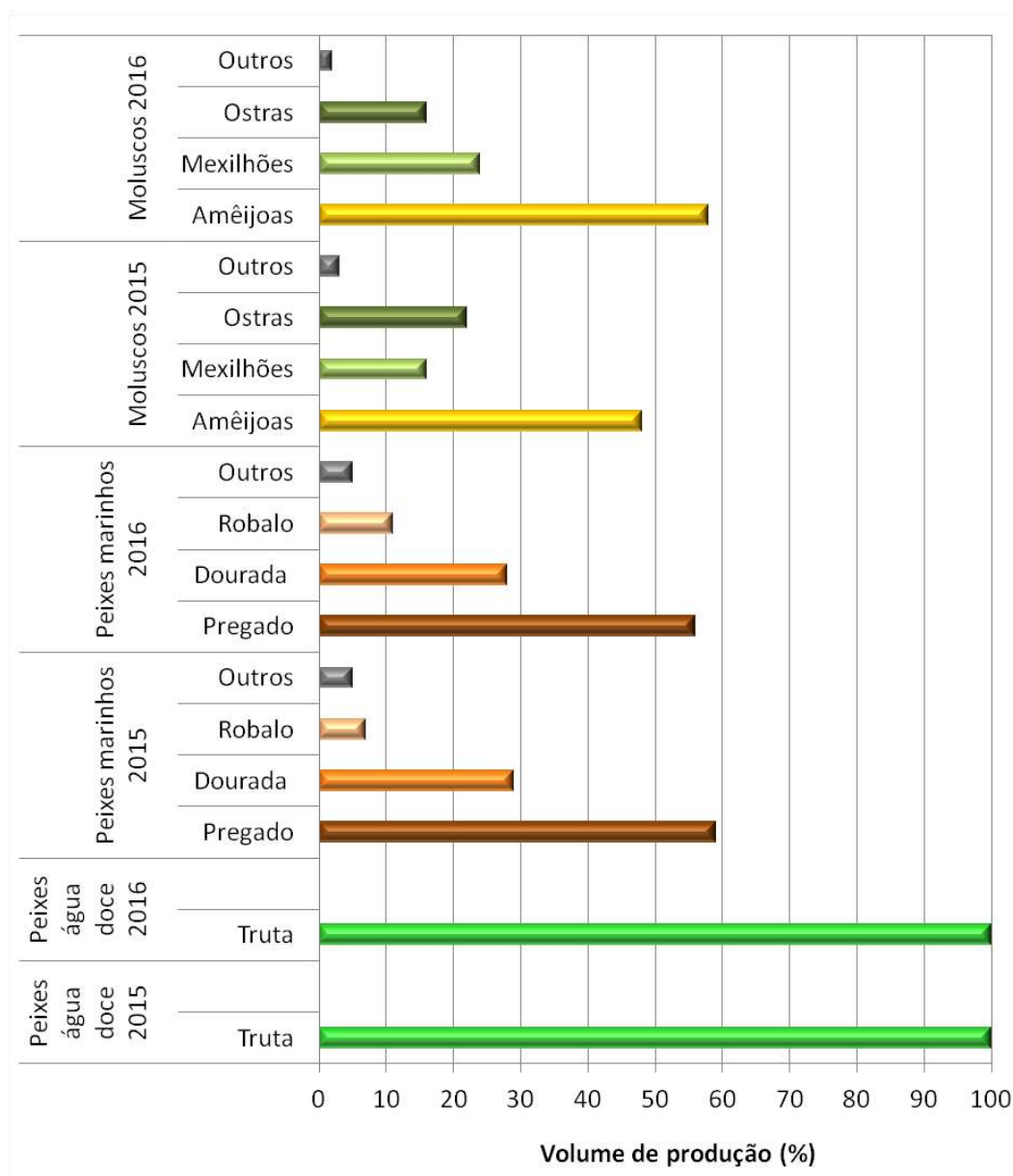


Figura 4: Volume de produção de espécies marinhas em aquacultura em Portugal (Fonte: Adaptado de INE, 2017 (29)).

Em 2014, a nível mundial, produziu-se cerca de 167 milhões de toneladas de produtos de pesca. Na Figura 5 pode-se observar que a captura no ano 2014 sofreu um aumento de 3,3 milhões de toneladas comparativamente ao ano de 2009, atingindo os 93,4 milhões de toneladas. Já na produção em aquacultura verificou-se um aumento mais significativo com a produção de 73,8 milhões de toneladas, mais 18,1 milhões de toneladas que em 2009. Da produção total de produtos marinhos em aquacultura no ano de 2014, os moluscos representam 16,1 milhões de toneladas, um aumento de cerca de 10 milhões de toneladas comparativamente ao ano de 2009 (46,47).

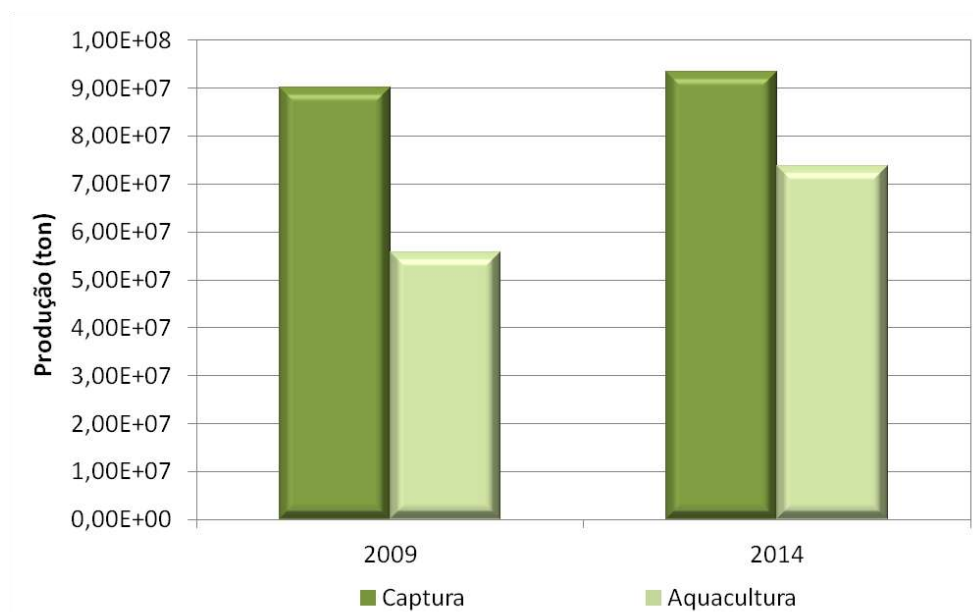


Figura 5: Produção mundial de produtos de pesca (Fonte: Adaptado de FAO, 2016 (47)).

A Figura 6 apresenta a produção nacional de produtos de pesca em 2016. Neste ano foram produzidos 11259 toneladas de produtos de pesca, gerando uma receita de cerca de 75 milhões de euros. Destes, cerca de 56,4% (6353 toneladas) representaram a produção de moluscos e crustáceos, com um crescimento de produção de 61,6% das amêijoas (3716 toneladas) e 12,1% dos mexilhões (1474 toneladas) comparativamente com o ano anterior (29).

Os “moluscos e invertebrados aquáticos vivos, frescos, refrigerados e congelados etc.” foram o 4º grupo mais importado por Portugal em 2017, representando o grupo com maior crescimento (+26,1%) dos produtos de pesca importados face a 2016, sendo os principais exportadores Espanha e China (29).

Relativamente às exportações, o mesmo grupo ocupou a terceira posição dos mais exportados por Portugal em 2017. Comparativamente ao ano anterior, verificou-se um aumento de 21% nas exportações, maioritariamente para Espanha (29).

Em 2017, gerou-se um défice da balança comercial do país devido à sobreposição das importações face às exportações. Em concreto, o grupo dos “moluscos e invertebrados aquáticos vivos, frescos, refrigerados, congelados etc.” apresentou um impacte negativo de 29,9 milhões de euros (29,46,57).

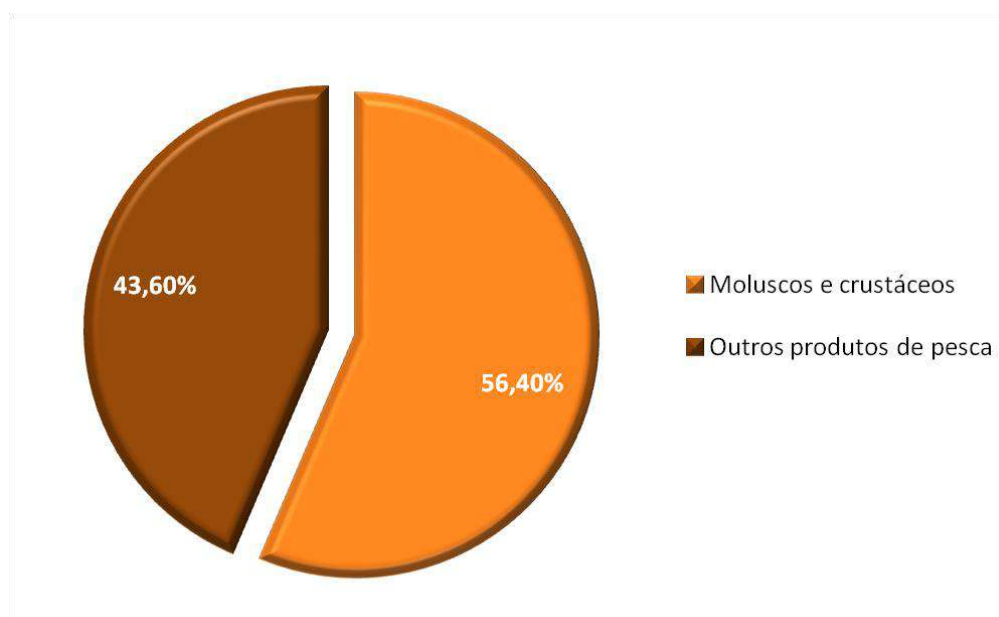


Figura 6: Produção nacional de produtos de pesca em 2016. (Fonte: Adaptado de INE, 2017 (29))

Como os bivalves são organismos filtradores e parte integrante da nossa dieta, é crucial que haja controlo da sua qualidade e segurança como recurso edível. Atualmente, existem regulamentos onde estão especificados valores máximos de compostos nocivos à saúde humana que poderão estar presentes nos moluscos bivalves, como o Regulamento (EC) Nº 1881/2006 e o Regulamento 854/2004 (14,48,52,58,59). Na União Europeia, diretivas como a 2006/113/CE e a 2004/41/CE caracterizam os valores dos parâmetros microbiológicos aceitáveis em crustáceos e moluscos, bem como nas suas águas marinhas, para a comercialização dos mesmos (59–61).

Capítulo II - Morfologia e caracterização nutricional dos bivalves

1. Morfologia

Os bivalves pertencem ao filo Mollusca, o qual representa o segundo maior filo animal em número de espécies, depois dos Antrópodes. O filo Mollusca inclui uma enorme diversidade de animais, abrangendo oito classes, nomeadamente, bivalvia, caudofoveata, cephalopoda, gastrophoda, monoplacophora, polyplacophora, scaphopoda e solenogastres. A classe bivalvia representa cerca de 27% do filo Mollusca e é a classe mais explorada como produto alimentar (62).

Os moluscos apresentam características muito distintas entre as diversas espécies, tendo como denominador comum o fato de serem animais invertebrados de corpo mole, dividido em cabeça, pé e massa visceral. A morfologia externa deste filo é caracterizada pela presença de um manto responsável pela secreção do esqueleto calcário que se manifesta sob a forma de concha, placas ou escleritos, a qual protege o corpo mole. Internamente possuem um sistema digestivo com rádula linguiforme, com dentes, e um celoma reduzido, ocupando quase a totalidade da cavidade pericárdica. O filo ainda apresenta uma forma larvar característica, a larva velígera. Os indivíduos são maioritariamente marinhos, embora também possam ser terrestres ou de água doce, distribuindo-se por diversos habitats, nomeadamente, areia, rocha, solo ou mesma na coluna de água (nadadores). Relativamente aos hábitos alimentares existem espécies carnívoras, herbívoras, filtradoras, detritívoras, parasitas ou comensais (62).

Os moluscos bivalves são espécies extremamente sensíveis às alterações do meio envolvente devido ao seu sistema vascular aberto, a hemolinfa, onde os hematócitos circulam atravessando a maioria dos tecidos e órgãos. Este sistema favorece a exposição direta dos moluscos bivalves ao ambiente onde se inserem. Alguns autores admitem que os hematócitos desta classe de organismo estão envolvidos em processos cruciais como a regeneração e reparação da concha e a digestão e transporte de nutrientes (13,21,63).

O sistema imunitário destes organismos é constituído apenas pelos componentes celular e humoral (sistema imunitário inato), carecendo do sistema imunitário adaptativo e, conseqüentemente, de anticorpos específicos para diferentes patogénios. Contudo, estes componentes imunitários demonstram ser suficientes e eficientes no combate de

infecções sendo porém muito afetados face a diversos fatores de *stress* ambientais (21,55,64). Os moluscos bivalves (Figura 7) possuem um corpo mole envolto num exoesqueleto de natureza proteica, a concha, constituído por duas valvas. O conhecimento e correta identificação das conchas são cruciais para determinar a que classe pertence o bivalve. As valvas são compostas por um ou dois músculos adutores, dependendo da espécie, responsáveis pelos movimentos de abertura ou fecho da concha. A abertura da concha dá-se automaticamente após o relaxamento dos músculos adutores. A articulação destes músculos formam uma estrutura denominada charneira que pode possuir dentes (13,46,55,65). Nos organismos adultos há uma grande variação no tamanho do exoesqueleto, os menores são de 5 mm podendo atingir mais de 20 cm de comprimento. O manto destes organismos é constituído por dois lobos, responsáveis pela segregação das valvas calcificadas, que envolvem o corpo dos moluscos bivalves (46,55,66). Contrariamente ao que acontece com as restantes classes de moluscos, nos bivalves não é possível distinguir a cabeça do corpo. O corpo é constituído por um pé e pelas brânquias, estruturas especializadas na respiração e alimentação. As brânquias são constituídas por pequenas lâminas com cílios cuja função é de conduzir a corrente de água para a cavidade paleal, onde se dá a digestão. Os organismos que se enterram na areia podem possuir dois sifões localizados nas brânquias, um inalante e outro exalante, local onde se dá a entrada e saída da água (49,55,65,67). A simetria dos moluscos bivalves é maioritariamente bilateral, podendo oscilar entre as formas alongadas e ovais (66).

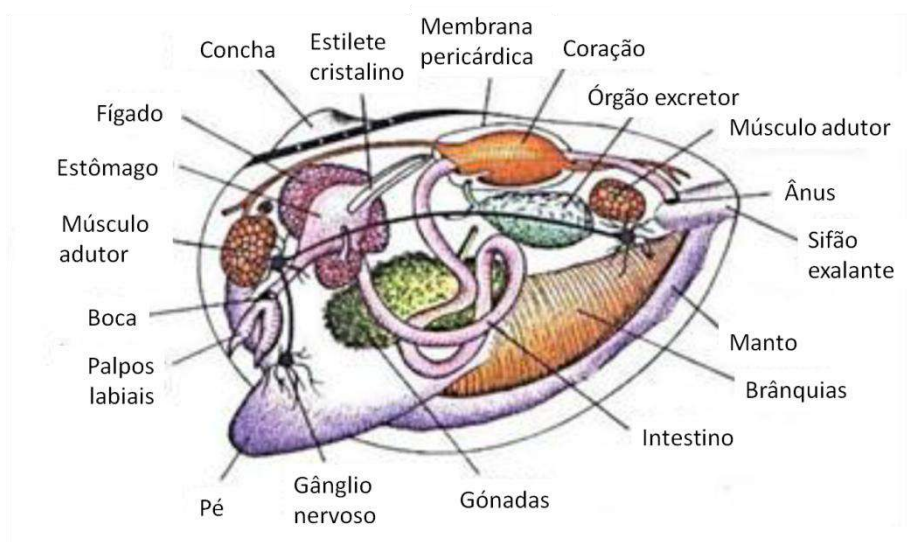


Figura 7: Morfologia interna dos moluscos bivalves. Adaptado de Cabral, 2015 (51).

Os moluscos bivalves são uma espécie maioritariamente marinha, podendo ser encontrados em água doce, com distribuição mundial e por diversas profundidades. Habitam locais onde haja um fluxo de água permanente, podendo ser sésseis, livres ou enterrados na areia. Estes organismos apresentam uma grande interação com a água e com os sedimentos, podendo ser classificados como filtradores ou detritívoros. Os primeiros alimentam-se das partículas em suspensão enquanto os segundos de detritos de matéria orgânica em decomposição. Na produção em aquacultura, a alimentação dos moluscos bivalves é à base de microalgas vivas, as quais podem variar consoante a espécie de bivalve e são previamente selecionadas em função do seu tamanho, toxicidade e mobilidade, assim como com o poder de digestão e assimilação das mesmas por parte do molusco bivalve. A densidade populacional dos moluscos bivalves num determinado ecossistema pode influenciar a comunidade de plâncton desse local uma vez que os bivalves têm uma alimentação seletiva, favorecendo a eliminação do meio de plâncton específico como picoplâncton e nanoflagelados fototróficos (13,46,66–69).

O ciclo de reprodução destas espécies está dividido em três fases. A primeira, embriogénese, onde o ovo passa a larva velígera. Nesta fase toda a energia necessária para o processo de transformação está dependente das reservas endógenas do ovo. A segunda fase antecede o processo de metamorfose dos indivíduos para o estado adulto e está dependente da qualidade e quantidade de alimento disponível no meio. A última fase consiste na transição e metamorfose do estado larvar para o estado adulto (70).

A recolha dos dados morfométricos é de extrema importância para averiguar as possíveis variações dentro da espécie, calcular a idade ou identificar subespécies. Nos bivalves, estas medições são geralmente realizadas segundo três eixos: comprimento, altura e espessura. Entende-se por comprimento a maior distância segundo o eixo antero-posterior. A altura é determinada como a maior distância segundo o eixo dorso-ventral e a espessura é a maior distância entra as duas valvas. Os dados recolhidos são cruciais para o cálculo da taxa de crescimento da população em função do comprimento ou da massa (71).







Os índices de condição dão-nos informações sobre a atividade metabólica do indivíduo perante determinadas condições ambientais. A composição nutricional dos bivalves é muito afetada por fatores bióticos e abióticos, por isso é importante

desenvolver índices que consigam fornecer informações acerca do estado fisiológico de uma dada população ou comunidade. Através dos dados morfométricos, são calculados inúmeros índices de condição que nos indicam o recente estado de saúde dos moluscos bivalves. Os índices de condição podem ser determinados através da razão parte edível/casca, onde entram diversos fatores como a massa do produto seco ou fresco e o comprimento. Estes índices são muito utilizados pelas indústrias produtoras de moluscos bivalves dado que o seu cálculo é de fácil determinação e não dispendioso. Assim, os produtores não só ficam a conhecer a condição fisiológica dos bivalves relativos às condições específicas do meio onde estão a ser produzidas, como garantem a qualidade do produto que estão a comercializar. Com a determinação do índice de condição é também possível prever novos locais para o desenvolvimento da aquacultura destas espécies, onde o crescimento e desenvolvimento serão maximizados (72–74).

1.1. Bivalves em estudo

No âmbito desta tese de mestrado foram analisadas seis espécies de moluscos bivalves (amêijoas, berbigão, lambujinha, lingueirão, mexilhão, e ostra). A Tabela 2 apresenta a classificação taxonómica das espécies em estudo.

Tabela 2: Taxonomia dos moluscos bivalves (75).

	Amêijoia boa	Berbigão	Lambujinha	Lingueirão	Mexilhão	Ostra
						
Reino	Animalia					
Filo	Mollusca					
Classe	Bivalvia					
Ordem	Veneroidea	Veneroidea	Veneroidea	Veneroidea	Mytiloidea	Ostreoidea
Família	Veneridae	Cardiidae	Semelidae	Solenidae	Mytilidae	Ostreidae
Gênero	Ruditapes	Cerastoderma	Scrobicularia	Solen	Mytilus	Crassostrea
Espécie	<i>Ruditapes decussatus</i>	<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Scrobicularia plana</i>	<i>Solen marginatus</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Crassostrea spp</i>

1.1.1. Amêijoia-boa (*Ruditapes decussatus*)

A amêijoia-boa, nome comum para a espécie *Ruditapes decussatus* (Tabela 2) é a amêijoia mais importante comercializada na Europa e muito apreciada pelas populações mediterrânicas, sendo a espécie de maior valor comercial na Europa (69).

Esta espécie tem uma vasta distribuição ao longo da zona costeira, desde o Mar do Norte até ao Senegal, bem como no Mediterrâneo e em zonas estuarinas. Em 2015, a distribuição geográfica da *Ruditapes decussatus* em Portugal estendia-se desde a Ria de Aveiro, Lagoa de Óbidos, estuário do Tejo, Troia, Foz do Sado, Rio Arade, Ria de Alvor e Ria Formosa (51). A maioria dos indivíduos desta espécie estão concentrados na Ria Formosa. A amêijoia-boa prefere zonas intertidais e subtidais e substratos arenosos ou lodosos. Tem uma distribuição vertical variável, dependente de diversos fatores, podendo atingir os 12 cm de profundidade. A distribuição geográfica horizontal da espécie depende das correntes e marés (51,63,69,76,77).

Relativamente à morfologia, o corpo pode apresentar uma cor que varia entre o cinzento claro e o castanho-escuro e uma concha oval com coloração variável. A cor da concha é influenciada pelo substrato onde o indivíduo se encontra, sendo mais esbranquiçada em ambientes arenosos e negra em ambientes lamacentos. As linhas e estrias que são observadas na concha da *Ruditapes decussatus* formam um quadriculado característico desta espécie. Apresenta a superfície externa das valvas convexa e a interna côncava que envolve o corpo do indivíduo. A amêijoia-boa possui um manto que integra os dois lobos que segregam as valvas, dois sifões separados em toda a sua extensão, brânquias bastante desenvolvidas e presença de cílios (responsáveis pelos processos de respiração e alimentação). Os músculos adutores, responsáveis pela abertura e fecho das valvas, assumem uma forma ligeiramente cilíndrica. A *Ruditapes decussatus* apresenta ainda um pé, que é responsável pela locomoção. Geralmente esta espécie apresenta um comprimento médio entre 2,5 cm e 4 cm, podendo chegar aos 7,5 cm (51,76–78).

A amêijoia-boa é considerada uma espécie gonocórica uma vez que o mesmo indivíduo pode produzir gâmetas masculinos e femininos, no entanto só é capaz de produzir um tipo de gâmeta por cada período de postura (reprodução dióica). Segundo Albentosa *et al* (2007), durante o outono e início do inverno a amêijoia-boa tende a acumular reservas de hidratos de carbono, nomeadamente glicogénio, antes do processo

de gametogénese. Posteriormente, irá usar esta reserva de energia no verão, quando ocorre a desova. Os gâmetas são libertados para o meio marinho, sendo que a fecundação se dá na água originando larvas planctónicas. Após o processo de desova observa-se uma estagnação do crescimento, seguido de um período de maior debilidade dos indivíduos. O estado larvar desta espécie ocorre 48 horas após a fecundação e designa-se por larva D ou velígera. Cerca de 4 semanas após a fecundação, as larvas sofrem uma metamorfose e adquirem a forma de uma amêijoia comum (51,78–80).

1.1.2. Berbigão (*Cerastoderma edule*)

O *Cerastoderma edule* (Tabela 2), popularmente conhecido como berbigão, é um molusco bivalve dominante nas zonas intertidais. Particularmente em Portugal, esta espécie está muito ligada à gastronomia tradicional e, consequentemente, sofre com a captura intensiva. O tamanho mínimo permitido para a captura e comercialização desta espécie em Portugal é de 2,5 cm (81–83). De entre os moluscos, o berbigão destaca-se pela riqueza em vitamina B12 (41 µg de B12/ 100 g de parte edível) (77).

Esta espécie apresenta uma concha relativamente pesada, com coloração exterior variável, de esbranquiçada a acastanhada. O berbigão alimenta-se de partículas em suspensão, nomeadamente fitoplâncton, zooplâncton e partículas orgânicas, e apresenta uma vasta distribuição geográfica, estando descritas populações destes organismos desde a costa da Noruega até ao Senegal, incluindo o mar de Barents no Ártico. Habita locais arenosos, enterrados à superfície dos sedimentos. Devido aos seus curtos sifões, o berbigão não tem capacidade de se enterrar a grandes profundidades, estando por isso muito próximo da superfície e em contacto com a atmosfera circundante. Contudo, na costa algarvia, o berbigão já foi encontrado até 7 metros de profundidade (77,81–85).

Outro traço característico destes organismos é a facilidade na adaptação a ambientes com flutuações constantes de salinidade, denominadas espécies eurialinas, resistindo em meios com baixa salinidade. Também são uma espécie osmoconformante, isto é, não são capazes de regular a pressão osmótica por movimento de entrada e saída de água. A osmolaridade dos berbigões é concordante com a do meio envolvente (27,77).

O berbigão apresenta uma marcada sazonalidade, observando-se uma elevada discrepância de biomassa entre os meses de inverno e verão. O seu crescimento é muito característico, observando-se quase total estagnação durante o período de Inverno. A taxa de crescimento, que pode ser determinada através das marcadas estrias na concha destes organismos, também é variável consoante alguns fatores. Entre estes, os mais determinantes são o tamanho do indivíduo, a densidade populacional do ecossistema e a altura da maré. Os fatores descritos anteriormente apresentam uma relação inversamente proporcional ao crescimento desta espécie. Apresentam um crescimento exponencial nos primeiros 2 anos de vida, abrandando após esse período. O seu ciclo de vida começa sob a forma larvar, tornando-se sésseis quando atingem o estado juvenil, 2 a 3 semanas após eclosão (81,82,85).

1.1.3. Lambujinha (*Scrobicularia plana*)

A lambujinha *Scrobicularia plana* (Tabela 2), também conhecida pelo nome de lamejinha, é também uma espécie de amêijoia, que tem uma distribuição geográfica ao longo da orla costeira nordeste do Oceano Atlântico e do Mar Mediterrâneo. Em Portugal é uma espécie muito comum, encontrada em zonas estuarinas e entre marés, predominante na Ria de Aveiro e no estuário do Tejo. Esta espécie apresenta um comportamento típico não territorial, uma vez que se encontra distribuída aleatória e uniformemente dentro do seu *habitat* (13,27,46,86,87).

Contrariamente à maioria dos moluscos bivalves a lambujinha é detritívora, alimentando-se de partículas orgânicas presentes nos sedimentos apesar de também conseguir filtrar partículas em suspensão. Os sifões recolhem as partículas da interface entre a água e a camada de sedimentos, sendo que a dimensão das partículas varia consoante a temperatura da água (em média esta espécie filtra preferencialmente partículas entre os 4 µm e os 40 µm). A presença desta espécie é facilmente detetável devido à marca em forma de estrela que os seus sifões deixam na superfície do solo. Assumem um papel importante na cadeia alimentar, sendo o principal alimento das aves, caranguejos e peixes dos ambientes onde estão inseridos (46,86–90).

Estes organismos apresentam uma concha fina e frágil, equilátera e com estrias de crescimento não uniformes. Distinguem-se dos restantes bivalves devido à sua concha quase perfeitamente oval e lisa. A cor exterior predominante é acinzentada e branca no interior. Tem a particularidade da valva esquerda possuir dois dentes e a valva direita apenas um. A lambujinha vive permanentemente enterrada e é geralmente encontrada em sedimentos lodosos ou arenosos, até 25 cm de profundidade. O seu comprimento médio é de 4 cm e o comprimento mínimo para a sua captura é de 2,5 cm. À semelhança do berbigão, esta a amêijoia também é uma espécie eurialina, sobrevivendo a ambientes com valores de salinidade baixos assim como oscilações bruscas de temperatura (espécie euritérmica). A sua reprodução dá-se nos meses de verão, manifestam características hermafroditas e são considerados organismos bissexuados. Contudo, a reprodução desta espécie é muito influenciada pela temperatura do meio, podendo adotar diferentes estratégias de crescimento e desenvolvimento consoante a variação deste parâmetro. As larvas são velígeras e os indivíduos demoram cerca de 2 a 3 semanas a atingir o estado adulto, sofrendo várias metamorfoses no processo (13,27,46,87–91).

Os contaminantes, de origem natural ou antropogénica, são muito acumulados nos sedimentos e por isso, a *Scrobicularia plana* é muito utilizada como organismo bioindicador de contaminação por metais pesados, uma vez que esta espécie se alimenta dos sedimentos e, conseqüentemente, concentra os metais na glândula digestiva (88,92).

1.1.4. Lingueirão (*Solen marginatus*)

O lingueirão *Solen marginatus* (Tabela 2), também popularmente conhecido em Portugal como navalha, é a espécie mais abundante da família Solenidae na costa Europeia e é largamente produzida e comercializada pelos países do sul da Europa como Portugal, Espanha, Grécia e Itália. Gastronomicamente é muito apreciada não só nestes países mas também em Marrocos e na Tunísia (70,93–95).

Solen marginatus possui características adaptativas distintas dos restantes moluscos bivalves. A concha é alongada e achatada lateralmente, com valvas semicilíndricas (Tabela 2). Esta anatomia permite que os lingueirões se enterrem rápida e verticalmente no

sedimento. Na porção anterior da concha encontra-se um sulco dorso-ventral saliente, apresenta músculos paleais muito desenvolvidos e não possui dentes laterais (70,96).

Os *habitats* preferenciais desta espécie são os ambientes estuarinos e lagoas, nas zonas subtidais (zonas nunca expostas completamente à maré vazia), ao longo da costa atlântica, oeste de África, o Mar Mediterrâneo e o Mar Negro. Vive enterrada nos sedimentos arenosos ou lodosos e, apesar de ser uma espécie filtradora, há poucos estudos e informação disponível acerca da nutrição destes organismos (70,95–97).

O ciclo reprodutor do lingueirão é marcado pelo curto período larvar (apenas 8 dias), consequência das elevadas reservas energéticas presentes no ovo. É uma espécie gonocórica com dimorfismo sexual relativo à coloração das gonadas. As fêmeas têm gonadas vermelhas-arroxeadas enquanto as gonadas dos machos apresentam uma cor esbranquiçada. Segundo Maia *et al.* (2006) nos períodos correspondentes à gametogénese inicial e pós-postura torna-se difícil a distinção entre o macho e a fêmea pela coloração das gonadas, que por vezes se torna impercetível (70,96–98).

A produção do lingueirão em aquacultura tem-se mostrado complicada devida às características particulares deste organismo como o curto período do estado larvar e a necessidade de sedimento particular que permita o enterramento vertical característico da espécie. Não há legislação relativo ao tamanho mínimo de captura desta espécie. Tal como outras espécies de moluscos bivalves, o *Solen marginatus* também tem um papel importante na dieta de algumas aves e caranguejos (70,97,98).

1.1.5. Mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*)

O mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (Tabela 2) é muito abundante em zonas intertidais e subtidais da costa atlântica e mediterrânea. São capazes de sobreviver em águas poluídas e com fortes pressões antropogénicas, formando colónias densas nas rochas, podendo ser encontrados até 40 m de profundidade. Vivem fixados a rochas mas são filtradores de partículas orgânicas e fitoplâncton em suspensão na coluna de água. Os mexilhões em estado adulto, apesar de serem organismos maioritariamente sésseis, têm a capacidade de se libertarem do substrato e, através das correntes marítimas, migrarem

para um local mais adequado à sua sobrevivência quando as condições ambientais são desfavoráveis (46,99).

A espécie *Mytilus galloprovincialis* é caracterizada por ser uma espécie dominante na costa sul de Portugal, capaz de colonizar vários *habitats*. Apresenta uma elevada taxa de crescimento para um largo espectro de temperaturas, elevada fecundação e resistência a parasitas e dessecação. O crescimento também é marcadamente maior nos meses mais quentes, uma vez que se verifica um aumento da disponibilidade de alimento e da taxa de filtração (99–101).

A concha do mexilhão é densa, lisa, equívale e parcialmente triangular. A coloração exterior é negra azulada ou arroxeadada, tem um umbo (vértice terminal) pontiagudo e encurvado e as margens praticamente retas. Interiormente, a concha é completamente lisa e mais clara. O corpo é mole e alaranjado com dois lobos simétricos. Exibe o músculo adutor anterior de menor dimensão comparativamente ao posterior. Devido à preferência por *habitats* rochosos e substratos sólidos, os mexilhões desenvolveram um bisso para se fixarem ao substrato, onde pequenos filamentos são segregados por glândulas bissogénicas localizadas no interior do pé. Esta espécie alimenta-se de partículas orgânicas e fitoplâncton em suspensão, é desprovida de dentes e pode atingir os 14 cm (46,53,102,103).

O ciclo reprodutor desta espécie é sazonal, mais intenso entre os meses de Abril a Outubro, altura em que a subida da temperatura estimula a desova e a fecundação dos ovos. O *Mytilus galloprovincialis* é uma espécie unissexual, liberta os gametas na água, onde posteriormente ocorre a fecundação. No estado larvar, a larva velígera nada por um período de cerca de 20 dias após o qual segrega uma concha primária para se fixar às rochas ou outro objeto que encontre (46,104).

Determinados organismos formadores de colónias são capazes de criar ou manter a complexidade dentro de um ecossistema, albergando várias espécies de animais e plantas marinhas. O *Mytilus galloprovincialis* é um exemplo desses organismos, chamados “engenheiros do ecossistema”. Devido à sua morfologia pontiaguda e crescimento em agregados, reúne as condições ambientais ideais e proporciona abrigo a várias espécies marinhas (predominantemente no estado juvenil, como os caranguejos), permitindo

ainda o crescimento e desenvolvimento de plantas marinhas. São uma espécie competitiva e dominante com facilidade em formar monoculturas (103,105).

1.1.6. Ostra (*Crassostrea* spp.)

Desde 1950 que a produção da ostra (*Crassostrea* spp.) tem aumentado exponencialmente assim como o seu consumo nos diversos países europeus, predominantemente no sul da Europa. Em Portugal existem genericamente cinco espécies de ostra, todas pertencentes à família Ostreidae: a ostra-portuguesa *Crassostrea angulata*, a ostra-japonesa *Crassostrea gigas*, a ostra-plana *Ostrea edulis*, a ostra-anã *Ostrea stentina* e a *Ostrea cochlear* (106,107).

Dentro do género *Crassostrea*, existem duas espécies: a ostra-portuguesa *Crassostrea angulata* e a ostra-japonesa *Crassostrea gigas*. Estas duas espécies diferem uma da outra não só morfologicamente mas principalmente na distribuição geográfica. A primeira tem uma distribuição que se reduz ao sul da Europa e Marrocos. A segunda já apresenta uma distribuição mais vasta, contudo, é uma espécie endémica do Japão. Posteriormente foi importada e cultivada em França (devido a uma doença que dizimou as populações da ostra-portuguesa) e, mais tarde, noutros países europeus. Em Portugal existem atualmente não só ambas as espécies mas a hibridação das duas (*Crassostrea* spp.) (Tabela 2) (14,106,108).

Grande parte dos consumidores de ostra prefere a ostra-portuguesa e, por isso, esta espécie é muito valorizada tanto económica como gastronomicamente. Também tem elevada importância ecológica dado que é considerada uma espécie indicadora de qualidade do ecossistema marinho e faz parte da dieta de várias espécies como aves marinhas, caranguejos, estrelas-do-mar e gastrópodes (106,107).

A ostra-portuguesa é encontrada em sistemas estuarinos, rios e lagoas, ocupando tanto as zonas intertidais e subtidais como zonas mais profundas dos canais dos rios. Prefere substratos arenosos, lodosos ou com conchas, é resistente a um espetro grande de salinidade (sobrevivendo em ambientes hostis, com salinidade de 2-6 ppt ou ‰). Esta espécie adapta-se facilmente em ambientes com grandes oscilações anuais, suportando temperaturas de 8 °C no Inverno e de 30 °C no Verão (13,76,106,107). A ostra-japonesa

Crassostrea gigas é menos tolerante à variação de salinidade, habitando ambientes com salinidades entre os 18‰ e 32‰. À semelhança da ostra-portuguesa, suporta um variado espectro de temperatura, porém prefere substratos mais sólidos, como barcos, madeira, rochas ou ferros, onde consegue ter uma vida sedentária (14).

As ostras do género *Crassostrea* são bivalves filtradores de partículas orgânicas e fitoplâncton em suspensão na coluna de água. A reprodução ocorre na água, onde são libertados os ovócitos e os espermatozoides. São espécies hermafroditas e são capazes de fecundar até 120 milhões de ovos por ano. O ciclo de vida é semelhante aos restantes bivalves, passando pelo estado larvar e sofrendo várias metamorfoses até chegar ao estado adulto (cerca de 22 dias depois do começo da fase larvar) (13,14,76).

2. Caracterização nutricional

Os bivalves têm um importante papel na alimentação dos portugueses e fazem parte da gastronomia tradicional de determinadas zonas do país, tendo até uma ação estimulante do apetite. Tradicionalmente, são consumidos crus ou ligeiramente cozinhados e por isso há uma certa exigência na qualidade da carne dos bivalves (13,48,55,109).

A composição nutricional dos moluscos bivalves depende de vários fatores como a origem geográfica, a temperatura ou a disponibilidade de alimento. Quando o alimento é abundante, os bivalves tendem a acumular reservas energéticas nos seus tecidos para posterior utilização em processos que requerem elevados gastos de energia, como a gametogénese e a desova. Devido à influência e variabilidades destes fatores, a determinação das taxas fisiológicas destes organismos é complexa e nem sempre conduz a resultados concordantes. Os fatores ambientais mais determinantes na atividade biológica e química dos moluscos bivalves são a natureza do substrato, salinidade, temperatura, luz e o oxigénio dissolvido na água. Quanto mais elevada a temperatura, maior a atividade metabólica destes organismos devido ao aumento da taxa de filtração da água, consumo de oxigénio e de alimento (13,14,46,48,55,80).

Nutricionalmente, os moluscos bivalves são caracterizados pelo seu reduzido valor calórico, elevado teor de aminoácidos essenciais e de ácidos gordos polinsaturados e

reduzidos valores em ácidos gordos saturados (Tabela 3). Apresentam elevado teor em proteínas, sendo estas de elevada qualidade biológica. Na dieta destes organismos, os hidratos de carbono representam o grupo mais consumido e, conseqüentemente, uma grande parte desse consumo é armazenada nos tecidos. A presença de determinadas vitaminas e minerais também são características nutricionais destas espécies (13,14,48,55,57,80,102,110,111).

Os bivalves são considerados produtos de pesca magros uma vez que apresentam um teor de gorduras inferior a 2% (13). Segundo Takagi (1986) o perfil de ácidos gordos dos invertebrados marinhos pode variar, dentro da mesma espécie, consoante as condições do meio envolvente, a temperatura, a dieta e o período dos ciclos de vida e reprodutor. Grande parte dos lípidos presentes são considerados lípidos bons (com elevado número de ácidos gordos mono e polinsaturados), com um perfil baixo de colesterol. No estado adulto dos moluscos bivalves, os lípidos que não têm utilização imediata são acumulados sob a forma de reserva energética e têm um papel importante na gametogénese. Os animais marinhos, contrariamente aos terrestres, são caracterizados por apresentarem elevados teores em ácidos gordos insaturados e de longa cadeia, aumentando a suscetibilidade à oxidação e outras reações químicas que diminuem a qualidade da carne e alteram as características organoléticas. Os ácidos gordos polinsaturados presentes nos bivalves, nomeadamente os ómega-3, são essenciais para a nutrição humana uma vez que previnem doenças cardiovasculares e auxiliam no correto crescimento e desenvolvimento humano. Assim, as gorduras provenientes destes organismos são saudáveis e necessárias para uma alimentação saudável (14,22,40,48,51,77,112).

Os elevados teores em hidratos de carbono dos bivalves, especialmente sob a forma de glicogénio, fazem com que este grupo se torne o mais importante em termos de reservas energéticas. Os hidratos de carbono sob a forma de reserva têm disponibilidade de uso imediato e o glicogénio tem um papel fundamental no ciclo reprodutor dos bivalves, verificando-se oscilações destes valores ao longo do ano (13,14,40,79).

Também os teores de minerais e proteínas, nos moluscos bivalves, tendem a variar consoante os diversos fatores bióticos e abióticos. De entre todos, os minerais essenciais que se destacam nestas espécies são o iodo e o selénio. No caso das vitaminas, observou-

se que estes organismos são dos mais ricos em vitamina B₁₂, nomeadamente o berbigão (77).

Relativamente às proteínas, estas subdividem-se em três categorias: sarcoplasmáticas, miofibrilares e do tecido conjuntivo. A qualidade proteica depende da proporção dos vários grupos, quanto menor o teor de proteínas do tecido conjuntivo, mais elevado o valor biológico das mesmas. O equilíbrio proporcional de aminoácidos essenciais e a sua digestibilidade também são fatores a ter em conta na caracterização das proteínas de alta qualidade. Nos moluscos bivalves não se verifica grande variação deste parâmetro com a alteração das condições ambientais e do ecossistema (77,113).

Os moluscos bivalves são organismos característicos de zonas de estuarinos e/ou lagunares, locais mais suscetíveis à contaminação antropogénica, onde as águas nem sempre manifestam elevada qualidade, apresentando contaminações químicas e microbiológicas. Segundo Campos e Cachola (2007), a acumulação de microrganismos pode variar consoante a salinidade, temperatura, luz ou pH da água. Para além dos fatores abióticos, fatores bióticos também estão implicados na bioacumulação de contaminantes pelos moluscos bivalves como a espécie, o sexo, a idade ou o peso corporal (14,22,26,31,114).

Recentemente, os moluscos bivalves surgem como espécies muito utilizadas e úteis para monitorizar a qualidade dos ecossistemas marinhos, sendo utilizados como espécies biomonitoras. A capacidade de bioacumulação de poluentes e contaminantes nos tecidos dos bivalves faz com que estes organismos possam apresentar uma ameaça à segurança alimentar e causar impactos negativos nos níveis mais elevados da cadeia trófica, nomeadamente para o Homem. De entre os contaminantes, os metais não essenciais e tóxicos como o mercúrio, chumbo, arsénio e cádmio são os mais preocupantes dado que têm efeitos carcinogénicos e mutagénicos. Como referido no capítulo anterior, atualmente na União Europeia existe legislação que determina os teores máximos admissíveis destes contaminantes nos moluscos bivalves para consumo humano. Para além dos compostos químicos, os moluscos bivalves podem transmitir diversas doenças aos seres humanos que consomem estes organismos. Bactérias saprófitas (maioritariamente *Vibrio spp.*), bactérias patogénicas (*E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*), vírus, biotoxinas e parasitas são exemplos de microrganismos e produtos derivados

destes que poderão estar presentes nos bivalves e ter efeitos nefastos na saúde dos consumidores (26,53,78,102,114–116).

Do ponto de vista do consumo humano, é essencial que haja controlo da qualidade e segurança dos bivalves devido à sua capacidade filtradora. Estes organismos tendem a acumular minerais nos seus tecidos, os quais são benéficos para o Homem em baixa quantidade, assim como alguns contaminantes, toxinas ou microrganismos patogénicos. A contaminação é inevitável, seja de origem natural (geológica) ou antropogénica (industrial, através da contaminação dos solos ou das águas). Contudo, só se torna prejudicial para o Homem em elevadas quantidades. Consequentemente, a natureza e concentração dos nutrientes e contaminantes vai-se refletir na qualidade dos bivalves. Por isso, é de extrema importância empregar métodos quantitativos e qualitativos que estejam legislados para o controlo da qualidade destes organismos (14,22,26,48,117,118).

Tabela 3: Composição bioquímica dos bivalves (119).

Amostra (fresco)	Parte edível (%)	Água (%)	Lípidos (%)	Hidratos		Fibras (%)	Proteína (%)	Energia (kcal)
				de carbono (%)	Sal (%)			
Amêijoia	27	81,1	0,9	2,6	0,6	0	11,7	65
Berbigão	21	82,5	0,7	2,7	1,0	0	10,5	59
Mexilhão	28	82,5	1,5	2,0	0,7	0	12,1	70
Ostra	9,0	83,0	1,7	3,9	0,9	0	8,60	65

Capítulo III- Biomarcadores de exposição ambiental versus biomarcadores de efeito

1. Biomarcadores: conceitos gerais e classificação

A água é essencial à vida na Terra, sendo imperativo a sua preservação, através da proteção dos sistemas hidrológicos, como as águas superficiais, subterrâneas, marinhas ou oceânicas, assim como dos respetivos ecossistemas. A água natural é um recurso renovável com múltiplas utilizações, nomeadamente, *habitat* de inúmeras espécies, recurso alimentar, atividades recreativas, práticas agrícolas e atividade industrial. Grande parte da preservação dos sistemas aquáticos marinhos integra medidas de prevenção da poluição de origem antropogénica, monitorização dos recursos hídricos e posterior seleção de biomarcadores para a deteção da contaminação dos ecossistemas marinhos (120).

A entrada de um xenobiótico, isto é, de uma substância química exógena num ecossistema, não representa por si só uma ameaça ao ambiente porque é necessário existir uma correlação entre as concentrações de exposição, a dose interna e a assimilação do contaminante por parte dos organismos. Para avaliar o impacto de um contaminante que entra num ecossistema, são avaliadas diversas alterações, quer à micro, quer à macro escala. Também são efetuadas medições ao nível molecular e celular, como a integridade genética e processos celulares, e são avaliados alguns parâmetros biológicos, como a taxa de reprodução e a taxa de crescimento, assim como é feita uma avaliação do comportamento de uma população ou comunidade inserida naquele ambiente. As alterações moleculares, geralmente de natureza bioquímica, são respostas imediatas dos organismos face a um fator de *stress*. No entanto, é difícil prever, a longo prazo, quais serão os efeitos provocados e o impacto ao nível ecológico e populacional. A relevância do impacto na população através da avaliação do crescimento e reprodução de uma população é muito maior e fornece-nos mais informações relevantes para a avaliação do risco de uma determinada substância para aquele determinado sistema biológico, embora a resposta dos organismos não seja imediata e as consequências não sejam visíveis a curto prazo. A avaliação das alterações ocorridas nos tecidos de um organismo após o contacto com o contaminante, são a melhor forma de avaliar o estado

de saúde do indivíduo. Porém, devido às características inerentes a este, esta avaliação só pode concluir sobre o estado fisiológico do organismo individual e pode não representar necessariamente o estado fisiológico daquela população, nem a qualidade do ecossistema (121–124).

A resposta dos organismos a um contaminante, pode variar inter e intraespecificamente e depende de diversos fatores, como a natureza da substância, as características adquiridas pelos organismos, a taxa de metabolização, a suscetibilidade individual e as condições e período de tempo do contacto. As respostas podem variar desde nenhum efeito até à morte dos organismos, incluindo efeitos adversos não visíveis, efeitos reversíveis ou irreversíveis, tóxicos ou não tóxicos. O desenvolvimento de ferramentas como os biomarcadores têm-se revelado importantes na avaliação da presença de fármacos ou outros xenobióticos nos ambientes aquáticos (125). Muitas espécies, desenvolvem mecanismos específicos, os quais são expressos através dos indicadores da exposição ambiental a que estão sujeitos. Em diversos moluscos bivalves, o *stress* oxidativo e a inibição ou estimulação de certas enzimas são indicadores de destoxificação do organismo contra os contaminantes (122,125)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (1993), um biomarcador inclui qualquer medição que reflete a interação entre o sistema biológico e o potencial perigo, que pode ser químico, físico ou biológico. A medição da resposta do organismo pode ser funcional ou fisiológica, bioquímica (nível celular) ou a resultante de uma interação molecular. Os biomarcadores funcionam como um alerta precoce de que os organismos adjacentes àquele ambiente estão sujeitos a um *stress* ambiental, provavelmente químico, induzido pela contaminação ou poluição do ecossistema. As vantagens da sua utilização prendem-se com a contaminação ambiental e a resposta dos diferentes sistemas biológicos à mesma contaminação. Assim, é possível detetar, com antecedência e sem provocar danos graves na natureza, a contaminação ambiental e os efeitos, maioritariamente reversíveis (devido à deteção precoce), no biota local (122,126). Assim, pode-se afirmar que os biomarcadores são indicadores de curto prazo de efeitos biológicos de longo prazo (123).

Na Figura 8 está representada a classificação dos biomarcadores em três classes: biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de suscetibilidade.

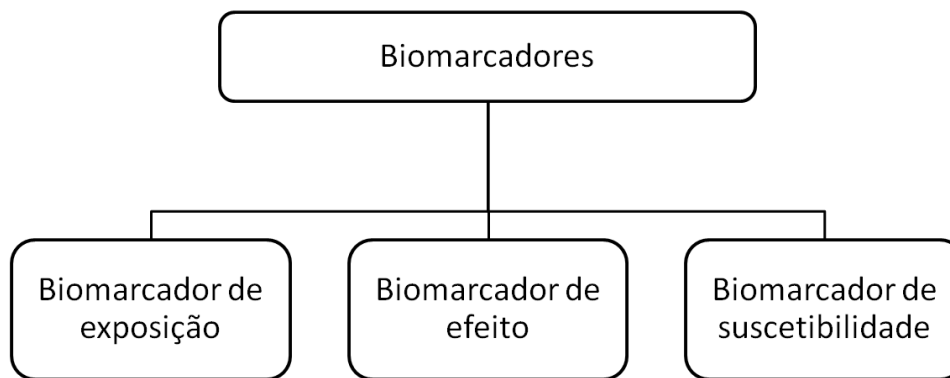


Figura 8: Classificação dos biomarcadores.

Os biomarcadores de exposição representam quaisquer substâncias exógenas ou os seus metabolitos que indicam a exposição ambiental dos organismos a um contaminante. Os biomarcadores de exposição são utilizados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, a determinada substância, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa do contaminante e a quantificação da exposição interna no(s) organismo(s) (122,123).

Os biomarcadores de efeito incluem quaisquer alterações bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais que possam ser medidas no(s) organismo(s) e cuja sua medição fornece informações acerca da magnitude da exposição e da integridade dos mesmos (122,123).

Os biomarcadores de suscetibilidade são caracterizados pela resposta específica, inerente ou adquirida, de um organismo face à exposição ao contaminante. Esta resposta inclui variações genéticas individuais e alterações nos recetores celulares e pode fazer variar a suscetibilidade de diversos organismos da mesma espécie (122,123).

O uso destes marcadores é de extrema importância para a correta e precisa avaliação do risco para diversos fármacos, nomeadamente na identificação do perigo, caracterização da dose-resposta e avaliação da exposição (122).

1.1. Indicadores de exposição ambiental

Ao longo dos anos, a poluição marinha tem sido objeto de interesse mundial e observou-se uma crescente preocupação no desenvolvimento de medidas preventivas.

Grande parte da contaminação das águas superficiais é de origem antropogénica e, atualmente as descargas dos efluentes urbanos das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) e resíduos agrícolas e industriais são as maiores fontes de contaminação/poluição dos ecossistemas marinhos, contudo os processos naturais de origem geológica e atmosférica também contribuem, em menor escala, para essa poluição (16,124,127–129).

Muitos dos xenobióticos provenientes dos efluentes urbanos que atingem as águas superficiais e marinhas são considerados pseudo-persistentes ou persistentes. O tratamento das águas antes da sua libertação no ambiente nem sempre é eficiente na eliminação de todos os compostos orgânicos devido não só ao amplo espectro de contaminantes presentes nessas águas, como à ineficácia dos processos de tratamento contra determinadas substâncias químicas contaminantes e/ou respetivos metabolitos. Devido à eliminação parcial dos poluentes, estes acabam por ser libertados nos ecossistemas marinhos e serem considerados persistentes, uma vez que o período de degradação natural é demasiado longo para o fluxo de descargas de águas no meio marinho. Alguns destes compostos pseudo-persistentes são produtos de elevado consumo pelo Homem e, apesar dos processos de tratamento, há uma contínua e constante libertação das águas tratadas mas ainda contaminadas nos rios, mares e oceanos. A sua ubiquidade é a razão pela qual não é possível a sua eliminação dos ecossistemas. Freitas *et al.* (2015) enfatizam os escassos estudos realizados e a falta de informação acerca da ecotoxicidade dos contaminantes apesar de estarem identificados e quantificados os contaminantes provenientes das águas residuais, antes e após tratamento (16,124,125,127,128,130–134).

Geralmente, os xenobióticos encontrados nos ambientes aquáticos apresentam um espectro de concentração compreendido entre os ng/L e os µg/L. Embora estas concentrações sejam muito baixas, as vias cinéticas e de distribuição nos ecossistemas não são bem conhecidas, nem os efeitos biológicos que podem ter na fauna e flora local, após exposição crónica a baixa concentração. Contrariamente a outros contaminantes, os fármacos são delineados, estudados e produzidos para maximizar o efeito nos organismos alvo, utilizando a menor dose para atingir o efeito pretendido. Assim, também pequenas quantidades destes compostos no meio aquático podem ter um grande impacto no seu equilíbrio e biodiversidade. Outro fator a ter em conta é o comportamento de uma

determinada substância química em diferentes ambientes. Um mesmo composto, onde os seus efeitos estão bem estudados num ambiente marinho, pode apresentar um impacto e um comportamento completamente divergente, por exemplo, num ambiente estuarino. Para além disso, a maior parte dos estudos realizados avaliam a(s) resposta(s) dos organismos decorrentes de uma exposição aguda a determinado contaminante. Esse tipo de toxicidade não mimetiza um ambiente natural, onde pequenas e regulares contaminações acontecem e onde os organismos estão sujeitos a uma exposição crónica e a doses sub-letais (125,126,133–136).

Para um composto ser considerado um biomarcador de exposição ambiental tem que obedecer a determinados critérios. O primeiro critério está relacionado com a taxa de consumo. Ele tem que ser um composto de consumo regular a nível mundial e numa quantidade significativa, sem previsão de que, num futuro próximo, deixe de ser consumido. Assim, garante-se que a distribuição do composto analisado é mundial e ubíqua devido à contínua descarga das águas residuais e outras para o ambiente. A deteção do composto tem de permitir a identificação da fonte de contaminação (antropogénica, natural, entre outras) e o grau de poluição do ambiente através da quantificação do contaminante. Outros fatores importantes são a capacidade de bioacumulação do composto e período de tempo até à sua degradação ou desaparecimento no meio aquático. Os métodos analíticos existentes para a deteção e quantificação do composto também é um critério essencial, uma vez que, se não existirem métodos validados e com baixos limiares analíticos (inerente à diluição, degradação e adsorção/absorção no ambiente) não é possível avaliar corretamente a qualidade do recurso hídrico em estudo. Tradicionalmente, as bactérias endógenas do Homem, como os coliformes fecais, eram utilizadas para monitorizar a contaminação antropogénica das águas superficiais e marinhas. Esta avaliação tem sido questionada porque o tempo de vida destas bactérias é curto e deste modo não pode fornecer dados de exposição a longo prazo (120,137,138).

Nas últimas duas décadas têm-se dado especial atenção à presença de fármacos no meio ambiente e ao seu potencial impacto nos diversos ecossistemas. Os fármacos pertencem ao grupo dos contaminantes de interesse emergente (CECs) (139–141).

Os “contaminantes de interesse emergente” são contaminantes que não se encontram regulamentados mas que, dependendo dos estudos de toxicidade e efeito nefastos sobre o ambiente e na saúde humana e animal e estudos de ocorrência no ambiente, se podem tornar potenciais candidatos em futuras regulamentações (139,142). A classificação destes contaminantes segue três abordagens distintas:

i) Compostos recentemente introduzidos no meio ambiente (por exemplo, medicamentos aprovados recentemente pelas autoridades competentes e que devido ao seu uso começam a entrar no ambiente) ou a compostos que se encontram presentes no meio ambiente há já algum tempo, mas cuja presença só recentemente tem sido detetada.

ii) Contaminantes ou poluentes não regulamentados, que se podem tornar candidatos para futuras regulamentações, dependendo dos resultados dos estudos sobre a sua toxicidade e/ou efeito nefasto sobre o meio ambiente e na saúde humana e animal e dos dados de monitorização relativos à sua ocorrência no meio ambiente.

iii) Poluente convencional já legislado, mas que devido a novos dados referentes à sua ocorrência, destino ou efeitos adversos, tornou-se de novo foco de atenção.

Segundo Gaffney *et al.* (2016) os CECs englobam uma diversidade de compostos, incluindo cianotoxinas, micotoxinas, aditivos de gasolina e industriais, retardantes de chama bromados, hormonas esteroides, substâncias tensioactivas, produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, compostos polifluorados, nanomateriais e subprodutos de desinfecção, bem como os produtos de transformação resultantes dos mesmos (140).

Nos últimos anos, os fármacos têm recebido especial atenção, facto refletido no número de estudos de ocorrência referentes a esta classe de contaminantes. Uma publicação de 2013, que analisa esta temática a nível global, refere a análise de 203 fármacos em 41 países, o que representa, no entanto, apenas 4% da totalidade de fármacos, considerando que só no mercado Europeu, aproximadamente 5000 produtos farmacêuticos tiveram autorização de introdução no mercado (141) . Estes contaminantes são particularmente importantes, porque, contrariamente à maioria dos poluentes, eles foram concebidos para terem uma ação específica no corpo humano e atuarem em concentrações muito baixas. A exposição crónica a concentrações baixas de alguns dos

fármacos encontrados no ambiente, como os antineoplásicos, hormonas, antidepressivos, antibióticos, analgésicos, anti-inflamatórios, antipiréticos e antidiabéticos, pode originar efeitos muito adversos na saúde humana, nomeadamente, lesão celular, desregulação endócrina, infertilidade, alteração comportamental, resistência aos antibióticos e alteração da pressão arterial, entre outros, o que torna relevante e necessário o estudo da ocorrência destes compostos no ambiente e estudos de avaliação do risco de exposição (139).

Os desreguladores endócrinos (EDs), os produtos de cuidado pessoal e farmacêuticos (PPCP) como anti inflamatórios, analgésicos, estimulantes e antibióticos, compostos estrogénicos e genotóxicos, bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas organoclorados (OCPs) e dibenzofuranos policlorados (PCDFs) estão entre os compostos ou grupo de compostos mais frequentemente encontrados nos ecossistemas marinhos e, por isso, considerados marcadores de exposição indicativos de contaminação antropogénica. Estes poluentes, que apenas recentemente foram alvo de atenção por parte da comunidade científica, podem afetar negativamente os ecossistemas, comunidades e populações marinhas e estuarinas, originando alterações fisiológicas nos organismos não alvo (16,124,125,127,128,130–132,136).

No âmbito desta tese e com base em estudos prévios na Ria Formosa (143) vamos dar ênfase aos fármacos, particularmente à cafeína.

Segundo Almeida *et al.* (2014), um dos fármacos mais utilizados e frequentemente encontrados nas águas salobras e marinhas é a carbamazepina (CBZ). Este fármaco é mundialmente prescrito no tratamento da epilepsia e a sua persistência e constante presença nos afluentes e efluentes oferece a ubiquidade necessária para ser considerado um bom indicador de contaminação pelo Homem. Ao longo da última década, as concentrações de CBZ no ambiente têm vindo a aumentar, não só devido ao aumento do consumo por parte da população mas também, porque os processos de tratamento das águas residuais não são eficazes na sua total eliminação e a sua degradação no meio natural é muito lenta (134,135,144). O paracetamol e o ibuprofeno também são fármacos utilizados regularmente pela maior parte da população, uma vez que são fármacos pertencente ao grupo de medicamentos de venda livre (medicamentos não sujeitos a receita médica) e com ação terapêutica de uso recorrente. Ambos têm atividades

analgésicas e anti-inflamatórias e são encontrados regularmente nos efluentes das ETARs (145,146).

Nos últimos anos, a cafeína (CAF) foi alvo de uma crescente preocupação, integrando também a lista dos CECs, decorrente do grande aumento do seu consumo pela população mundial e os elevados valores nas águas residuais. No entanto, os estudos de ecotoxicidade, tanto da cafeína como dos restantes CECs, são escassos, especialmente nos meios aquáticos (136,145,146).

Os bivalves, como são organismos filtradores e porque se alimentam de matéria orgânica e detritos em suspensão na coluna de água ou no substrato tendem a acumular os contaminantes presentes no ambiente circundante nos seus tecidos e consequentemente são bons bioindicadores de contaminação ambiental (137,144,146,147).

1.1.1. Cafeína

1.1.1.1. Caracterização química

A cafeína, 1,3,7-trimetilxantina (Figura 9), é uma xantina alcalóide, consumida mundialmente em elevadas quantidades. É uma substância amarga, branca e cristalina, isolada em 1819 a partir da planta do café. Este composto, da família das xantinas, é encontrado em diversas plantas e a sua quantidade é variável consoante a espécie vegetal. Pode ser facilmente encontrada em grãos de café, folhas de chá verde e nas sementes de cacau. Já foi encontrada em, pelo menos, 63 espécies vegetais e podem estar presentes em sementes, folhas ou frutos. Esta substância é caracterizada pela elevada solubilidade em água (13 g/L), estabilidade e baixa volatilidade (praticamente nula) (7,148–152). A cafeína tem um coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) de -0,07 indicando que é uma substância de elevada solubilidade em água e um $pK_a = 10,4$, indicando que é um ácido fraco (153).

A cafeína é considerada uma substância psicoativa, com atividade estimulante do sistema nervoso central (7,148,154) e, por essa razão, faz parte da composição de inúmeros medicamentos e bebidas (café, chá, bebidas energéticas e refrigerantes são as principais fontes de consumo de cafeína do ser humano) (7,120,154). Nos medicamentos,

a cafeína é usada como excipiente e é adicionada para maximizar os efeitos dos analgésicos (120,148).

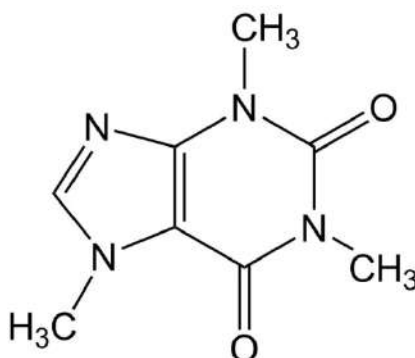


Figura 9: Estrutura química da cafeína.

1.1.1.2. Presença da cafeína nas águas marinhas

O ecossistema marinho é alvo da descarga de vários tipos de poluentes associados às atividades antropogênicas e conseqüentemente acumula uma grande diversidade de compostos, como metais e compostos orgânicos persistentes. Nos últimos anos, a preocupação focou-se nos fármacos que estão a propagar-se nos meios aquáticos, causando a destruição e alteração da biota desses *habitats*. As principais fontes de contaminação das águas superficiais pelos fármacos são os efluentes das ETARs, escorrência agrícola e os efluentes das pecuárias e da aquacultura. Ao longo dos anos, verificou-se um aumento contínuo na frequência de detecção e na concentração destes compostos nas águas, atingindo valores na ordem dos µg/L (2,4,136,145).

A cafeína faz parte dos compostos usualmente presentes nos estudos de ocorrência ambiental, em águas doces (155) ou águas salgadas (156) sendo um bom indicador de contaminação antropogénica. Encontra-se distribuída mundialmente e é considerada um composto pseudo-persistente, uma vez que, apesar de degradável, não se consegue eliminar do ecossistema marinho devido à sua contínua descarga no ambiente (5,6,136).

Após ingestão, a cafeína é rapidamente absorvida e distribuída por todo o corpo, já tendo sido detetada na saliva, leite materno e na circulação sanguínea dos recém-nascidos (154).

A cafeína é absorvida no intestino delgado, metabolizada nas células do fígado e é distribuída a todos tecidos corporais ao fim de alguns minutos após a sua ingestão.

Distribui-se proporcionalmente nos tecidos em função do seu teor em água, entrando e saindo de vários órgãos a taxas diferentes. A cafeína é decomposta nos seguintes compostos: paraxantina (84%), teobromina (12%) e teofilina (4%)(157). A paraxantina é o metabolito mais representativo e tem o efeito de aumentar a lipólise, aumentando os níveis de glicerol e de ácidos gordos livres no plasma sanguíneo. Os principais metabolitos da cafeína na urina são a 1-metilxantina (1X), o ácido 1-metilúrico (1U), o 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracil (AFMU), o 5-acetilamino-6-amino -3-metiluracil (AAMU) e ido 1,7-dimetilurico (17U), que são formados pelo metabolismo secundário da paraxantina. A cafeína inalterada é um produto de menor excreção, responsável por 1 a 2% da dose de exposição (158–160). A forma não dissociada da molécula que é solúvel na membrana gástrica lipoidal é a forma na qual a cafeína é absorvida e uniformemente distribuída nos tecidos. A ligação da cafeína às proteínas plasmáticas é de cerca de 25–30%, e a cafeína remanescente com elevada lipossolubilidade e baixa ligação às proteínas pode penetrar rapidamente em vários tecidos (161).

O Homem metaboliza quase na totalidade a cafeína que ingere. Após metabolização hepática a cafeína é excretada intacta na urina entre os 0,5% e 10% (7) .

Embora a taxa de eliminação da cafeína inalterada seja muito baixa e os processos de tratamento na ETAR sejam muito eficazes na eliminação da cafeína (81-99,9%), a concentração libertada para o ambiente é significativa e por isso, a cafeína é utilizada como indicador de exposição a poluentes de origem antropogénica (7,120,148,154).

Recentemente foram desenvolvidos muitos estudos no sentido de identificar e quantificar o maior número de contaminantes de origem antropogénica. No entanto, esses estudos têm-se focado no desenvolvimento de métodos para a sua monitorização e não nos estudos da toxicidade nos seres vivos. Cruz *et al.* (2016) afirmam que os estudos em animais são escassos, principalmente em invertebrados como os bivalves. Senta *et al.* (2015) também afirmam que contrariamente ao que seria de esperar, nos estudos de ocorrência da cafeína não são monitorizados os seus principais metabolitos, nomeadamente a 1-metilxantina e a 7-metilxantina (7,162).

As fontes e os processos de contaminação das águas, bem como a avaliação da sua extensão já estão estudados e identificados. Os xenobióticos, particularmente a cafeína, entram nos ambientes aquáticos por várias vias e estão regularmente presentes em todos os tipos de água, nomeadamente, águas superficiais ou subterrâneas, águas doces, salobras, salinas ou mesmo oceânicas. As principais entradas da cafeína nos ambientes marinhos (Figura 10) são a descarga dos efluentes das ETARs diretamente para o mar aberto ou para rios, os quais desaguam posteriormente no mar, águas subterrâneas contaminadas, sistemas de tratamento de águas urbanas e o escoamento de águas pluviais (163).

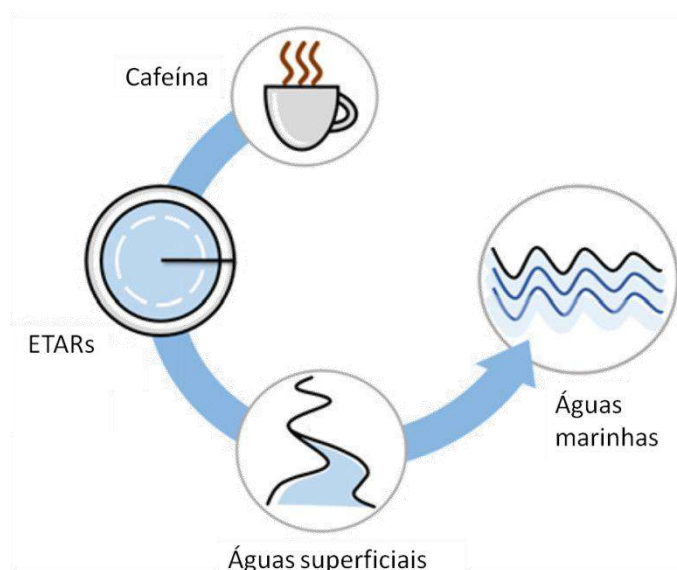


Figura 10: Processo de contaminação do ecossistema marinho. Adaptado de Dafouz *et al.* 2018 (6).

Segundo Moore *et al.* (2008), em vários estudos de ocorrência, a cafeína foi o quarto composto mais detetado nas águas, estando presente em cerca de 70% das amostras analisadas. Cruz *et al.* (2016) cita estudos de vários autores que analisaram os afluentes e efluentes das ETARs e detetaram elevadas concentrações de cafeína na água. A maior concentração, como previsto, situava-se nos afluentes onde se chegou a registar concentrações de 293 µg/L de cafeína. Diversos estudos apontam também para uma contaminação nos diversos sistemas hidrológicos existentes (7,164). Em Portugal, há registos de cafeína nos afluentes e efluentes de uma das maiores ETAR nacionais, com concentrações entre 49 µg/L - 273 µg/L e até 2,9 µg/L, respetivamente. A frequência de deteção é de 100% nos afluentes e de 92% nos efluentes (165).

1.1.1.3. Toxicidade

Existe pouca informação acerca da ecotoxicidade de muitos contaminantes, incluindo a cafeína, nos ambientes marinho. Muitos dos estudos realizados estão direcionados para a toxicidade deste estimulante no Homem e em espécies terrestres, ao invés de espécies marinhas. Para além disso, grande parte dos ensaios são realizados através da exposição aguda, descartando os possíveis efeitos tóxicos em exposições a longo prazo (crónicas) (130,154,166).

No Homem, a cafeína afeta o sistema nervoso central e alguns autores consideram que também há interferência com o sistema cardiovascular (148,149). Quando ingerida em quantidades elevadas, este composto incita a um melhor desempenho das atividades, aumenta o estado de alerta do indivíduo e combate a fadiga, podendo também estar envolvida na perda de peso. No entanto, também provoca efeitos que podem pôr em risco a saúde do consumidor, como a privação do sono e agravamento da irritabilidade e ansiedade (148,150,152). Os sinais mais evidentes de toxicidade por ingestão de cafeína são febre, fraqueza, tonturas, edemas cerebrais, arritmias cardíacas, hiperglicemia e, em casos mais grave, coma e morte (167). Segundo De Maria e Moreira (2007), um estudo acerca dos efeitos provocados pelo consumo de cafeína no Homem, indicam que uma dose de 4,6 mg/kg de peso corporal (valor máximo) não apresenta qualquer risco para a saúde de um indivíduo adulto e saudável (148). Contudo, o Regulamento (EU) Nº 37/2010, responsável pelo estabelecimento dos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal, não especifica nenhum valor para a cafeína (168).

Fraker e Smith (2004) realizaram um estudo acerca da toxicidade de alguns contaminantes nos sapos, concluindo que a presença de alguns fármacos, como a cafeína, provocou alterações fisiológicas e comportamentais nestes organismos (130). Rodriguez del Rey *et al.* (2011) enumerou também diversos estudos onde foi comprovada a atividade tóxica e os efeitos adversos que este composto estimulante poderia provocar em diferentes espécies marinhas (166). Os efeitos oxidativos e a perda da permeabilidade membranas nos mexilhões (21), a alteração da taxa de respiração e a clivagem(169), a inibição mitótica nos ovos do ouriço-do-mar (170) e a descoloração de algumas anémonas tropicais (171) são alguns dos efeitos da exposição à cafeína. Os recetores antagonistas dos neurotransmissores de adenosina e de ácido gama aminobutírico (GABA) e os

inibidores de fosfodiesterases são alguns dos mecanismos de ação que ocorrem na presença de cafeína (mesmo em baixas concentrações) e que são capazes provocar alterações profundas no estado fisiológico de muitos organismos. No fim da década passada, alguns estudos realizados em animais e humanos, associavam a cafeína a alterações da reprodução, como a fertilidade, abortos espontâneos, deficiências à nascença, entre outros (154). Contudo, estas informações não foram consolidadas por estudos posteriores, uma vez que, as quantidades de cafeína necessária para a ocorrência destes efeitos tóxicos eram substancialmente superiores às quantidades usualmente ingeridas (154).

Aguirre-Martínez *et al.* (2016) demonstraram os efeitos tóxicos provocados pelos fármacos nas amêijoas, em doses sub-letais. Nos ensaios *in vitro*, quando estas foram expostas à cafeína, apresentaram sinais de neurotoxicidade e *stress* oxidativo (125). No mesmo ano, também Cruz *et al.* (2016) realizou um ensaio laboratorial com o mesmo objetivo e provou que os bivalves, nomeadamente as amêijoas, são realmente afetadas pela cafeína presente no meio marinho. Estes bivalves tentam arranjar estratégias para combater a toxicidade, como o aumento da atividade de algumas enzimas antioxidantes e de biotransformação ou o aumento da taxa metabólica. No entanto, estes mecanismos não são eficazes, provocando um aumento da oxidação dos seus tecidos e a perda de peso corporal, devido ao gasto da energia (consumo de hidratos de carbono, nomeadamente glicogénio) (7). Por outro lado, Capolupo *et al.* (2016) analisou mexilhões mediterrâneos, submetendo-os a diferentes concentrações de cafeína *in vitro*. Para a concentração de 500 ng/L não se verificou quaisquer alterações significativas no seu estado fisiológico, concluindo que, naquela concentração, a cafeína não provocou efeitos adversos e de *stress* a esses bivalves (5). Porém, em todos os estudos referidos, ocorreu uma seleção da dimensão dos bivalves e tanto as condições ambientais laboratoriais, nomeadamente temperatura, pH, fotoperíodo, salinidade, oxigénio dissolvido, como as concentrações dos fármacos foram parâmetros regularmente controlados. Assim, estas condições não mimetizam o ambiente natural destes moluscos bivalves, onde há oscilações constantes destes fatores e, conseqüentemente, as alterações ocorridas ou a ausência delas podem não corresponder às que ocorreriam no meio natural, sob condições não controladas.

1.2. Biomarcadores de efeito

Um biomarcador de efeito diz respeito a qualquer alteração fisiológica, bioquímica, molecular, comportamental ou reprodutiva que possa ser medida e que funciona como um alerta precoce de que o organismo não está nas suas condições ótimas. Idealmente, um biomarcador de efeito seria aquele em que o efeito produzido não afetasse permanentemente o organismo e que se identificasse, imediata e precisamente, qual a origem do perigo. Porém, nem sempre é possível encontrar um biomarcador com essas características. Maioritariamente, um biomarcador está associado a diversas fontes de contaminação e a diferentes origens, pelo que a sua determinação, por si só, não fornece informações sobre a razão pela qual o organismo está sob *stress* (5,122).

Estes biomarcadores são extremamente importantes para a análise do risco, principalmente em processos quantitativos como a avaliação da dose-resposta. Os biomarcadores relacionados com efeitos tóxicos são os preferíveis no que toca a essa avaliação, uma vez que a extrapolação dos dados para os humanos é mais correta e precisa. Contudo, é de destacar a variabilidade das respostas intraespecífica, uma vez que, cada organismo tem uma resposta a uma determinada dose de xenobiótico, a qual pode ser diferente à de outro indivíduo da mesma espécie, inserido no mesmo ambiente e exposto à mesma concentração (122,126).

Cada biomarcador está associado a uma toxicidade específica para um sistema do organismo, entre elas, nefrotoxicidade, toxicidade respiratória, neurotoxicidade, lesões no DNA, toxicidade hepática, imunotoxicidade, stress oxidativo, entre outras (122). Particularmente no ambiente marinho, há biomarcadores específicos para detetar a poluição marinha através da análise do biota local. Os biomarcadores mais frequentemente utilizados são os produzidos pela indução enzimática do citocromo P4501A, a atividade da acetilcolinesterase, a integridade do DNA, a atividade do sistema de transporte de eletrões, as metalotioneínas (proteínas) e a peroxidação lipídica (7,19,20). À exceção do citocromo P4501A, que é monitorizado quase exclusivamente em peixes, os restantes estão associados a biomarcadores de efeito nos moluscos bivalves, caracterizados por nos indicarem o estado fisiológico daqueles organismos num determinado local (20).

1.2.1. Acetilcolinesterase

A acetilcolina (ACh) está integrada no sistema nervoso de muitos vertebrados e invertebrados. A acetilcolina é um neurotransmissor responsável por transmitir impulsos nervosos entre os neurónios. Está amplamente distribuída por todo o sistema nervoso, e nos organismos aquáticos, encontra-se uma grande diversidade de colinesterases (enzimas associadas à transmissão da informação) com propriedades bioquímicas distintas e os diversos organismos apresentam diferentes sensibilidades para os compostos que inibem essas enzimas (20,172). Segundo Araújo *et al.* (2016), esta molécula é caracterizada por se fixar à membrana celular com uma porção de colagénio e apresentar três ramificações (com 4 locais de ligação cada uma) ligadas, por pontes dissulfureto, ao colagénio (Figura 11) (173,174).

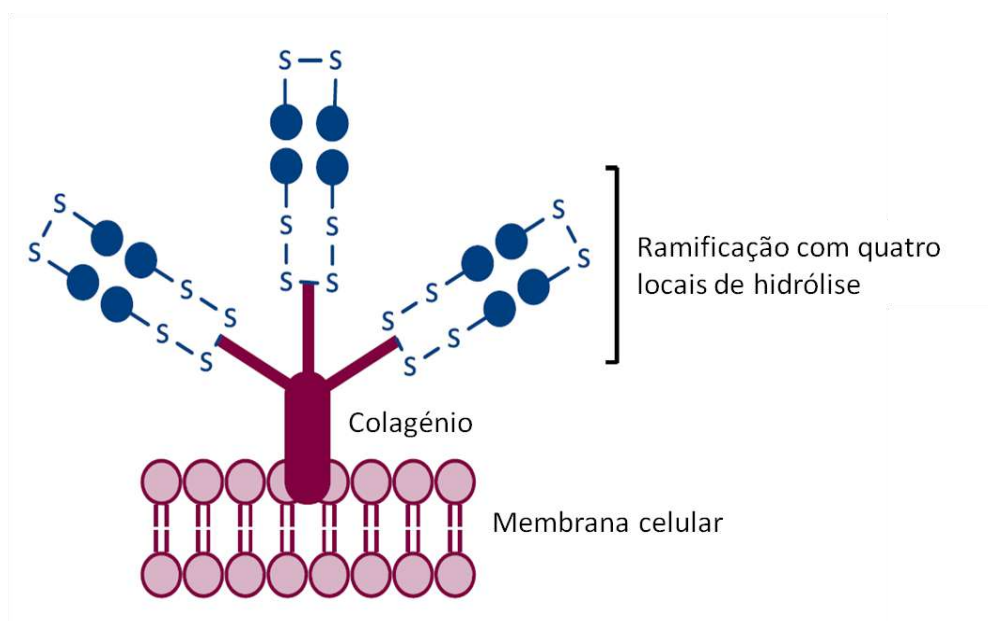


Figura 11: Estrutura química da acetilcolinesterase (AChE). Adaptado de Araújo *et al.* 2016 (173).

No processo de transmissão de um sinal, a ACh é sintetizada a partir dos seus precursores, acetilcoenzima A e colina, mediante a ação da enzima colina acetiltransferase. Quando a célula nervosa é estimulada, dá-se a libertação da ACh. Após a transmissão da informação, a ACh é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) nas junções neuromusculares em colina e ácido acético (173–176).

A AChE é uma enzima que desempenha um papel muito importante no processo de transmissão de uma informação e a sua inibição ou reativação pode levar a lesões graves no estado fisiológico dos organismos. Esta enzima faz parte do sistema colinérgico, caracterizado por todas as sinapses que apresentam a ACh como neurotransmissor. A classe de enzimas pertencentes a este sistema são as colinesterases, que, por sua vez, são constituídas pela acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE), sendo que a primeira tem maior afinidade com a acetilcolina. Tal como já mencionado, as colinesterases são responsáveis pela hidrólise da ACh a colina e ácido acético, processo segundo o qual a célula nervosa volta ao estado inicial ou de repouso (19,173,174,176).

A inibição da enzima AChE tem consequências graves nos organismos e, normalmente, está associado à presença de xenobióticos no ambiente, como os metais (172), os fármacos (173), os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (177) e os pesticidas (173). No grupo dos pesticidas, a classe dos organofosforados e carbamatos estão fortemente associados à inibição da AChE e, conseqüentemente, a um estímulo constante dos neurónios pré-sinácticos, os quais nunca retornam ao seu estado de repouso. O grau de inibição é utilizado como biomarcador de efeito neurotóxico em várias espécies e pode ser utilizado como indicador de exposição a pesticidas (173,174,178). No entanto, como se trata de um biomarcador enzimático, podem ocorrer variações sazonais dos níveis de AChE basal no mesmo organismo, não existindo um valor fixo que indique o ótimo estado fisiológico da espécie ou mesmo do indivíduo (179).

A AChE apresenta funções e características muito homogêneas entre os vertebrados enquanto, no caso dos invertebrados, a enzima exibe um grau de complexidade superior. Nos invertebrados, a acetilcolinesterase pode apresentar vários polimorfismos entre organismos do mesmo filo devido à codificação genética nestes organismos, que pode ocorrer em um ou múltiplos genes (180).

Nos invertebrados marinhos, a AChE está bem estudada e caracterizada e, os bivalves em particular, apresentam elevada atividade desta enzima na hemolinfa. Contudo, Rickwood e Galloway (2004) afirmam que a sua função, bem como a função da ACh, nos moluscos bivalves ainda não são bem compreendidas. Está descrito a existência de diversas colinesterases assim como uma elevada variabilidade intraespecífica da atividade

da AChE nos invertebrados marinhos, o que dificulta a interpretação dos estudos de toxicidade (181).

Nos bivalves, a AChE encontra-se presente em nervos colinérgicos, não colinérgicos e na hemolinfa. A sua função, embora ainda pouco compreendida, está documentada apenas para os sistemas colinérgicos, existindo um desconhecimento do papel desta enzima noutros sistemas ou tecidos. Alguns autores referem que a AChE não colinérgica pode funcionar como um fator de crescimento neural, porém não existem quaisquer confirmações que corroborem esta teoria (181). O fator com maior influência na variação intraespecífica da atividade basal da AChE é a temperatura embora outros também provoquem variações como a idade, o sexo ou o ciclo reprodutor (182). O estudo realizado por Dellali *et al.* (2001) demonstrou a influência da temperatura na atividade da AChE nas amêijoas e mexilhões, sendo tanto menor quanto maior a temperatura (183). Robillard *et al* (2003) chegou à mesma conclusão ao analisar mexilhões de água doce e, ainda comprovou a relação da atividade desta enzima com o pH, obtendo um gráfico em “U” com o aumento do pH (179).

Nos estudos de toxicidade, também aplicados aos bivalves, é importante relacionar os efeitos nocivos e o tecido analisado. A concentração de acetilcolinesterase é variável consoante os diferentes tecidos, órgãos ou sistemas, podendo apresentar diferentes sensibilidades aos xenobióticos inibidores da AChE (70).

1.2.2. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) é um processo que ocorre tanto em animais como em plantas onde a formação de radicais, o rearranjo das ligações duplas e a destruição das membranas lipídicas predominam. Estes processos formam compostos que podem ser tóxicos para os organismos, como os álcoois, os aldeídos, os ésteres e as cetonas (184).

Os radicais livres são átomos ou grupo de átomos que possuem um eletrão desemparelhado na orbital externa. São caracterizados pela elevada instabilidade e reatividade e podem ser originados no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas celulares (185).

Há vários estudos nos sistemas biológicos relativos à formação de espécies reativas e às lesões celulares e tecidulares, as quais podem estar associadas à morte de um dado organismo. O grupo mais estudado são as espécies reativas de oxigénio (ROS), do qual fazem parte os radicais de oxigénio ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) (185) .

Nos sistemas biológicos há formação regular de radicais livres, embora o processo adjacente à sua formação ainda não esteja bem compreendido. Os radicais de oxigénio OH^{\cdot} são moléculas vulgarmente encontradas nos organismos vivos, muito reativas, capazes de atacar e provocar lesões em diversas moléculas biológicas, desencadeando reações em cadeia com radicais livres. Geralmente, estas reações em cadeia ocorrem quando há interação entre um radical e um não radical. Assim, quando há uma produção excessiva de radicais livres no organismo, a probabilidade de ocorrência de reações em cadeia nos sistemas biológicos é grande, uma vez que as moléculas desses sistemas são maioritariamente não radicais e a sua interação com moléculas radicais despoleta estas reações em cadeia. A presença de determinados metais nos tecidos dos organismos também é um fator de indução da formação de radicais livres. Segundo Halliwell e Chirico (2016), a peroxidação lipídica é o processo biológico mais estudado resultante dessas reações em cadeia (19,186–188).

Grande parte dos organismos possuem mecanismos de defesa para combater a formação de radicais livres e a oxidação das moléculas, células ou tecidos alvo. Um deles é a formação das enzimas superóxido dismutase e outros antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. Contudo, estes mecanismos por vezes não são suficientemente eficazes para combater a elevada produção e o poder oxidativo dos radicais livres. Consequentemente, os indivíduos sofrem *stress* oxidativo que provoca lesões no DNA, aumento do Ca^{2+} intracelular e a perda da seletividade dos transportadores membranares. O grau de toxicidade nos organismos vivos varia consoante vários fatores como a quantidade de espécies reativas de oxigénio (ROS), a eficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes ou o tipo de célula ou molécula alvo. Gutteridge (1995) afirma que há uma predisposição para o aumento de LPO nos tecidos contaminados relativamente a tecidos saudáveis (19,186,187,189).

A peroxidação lipídica é uma consequência direta do *stress* oxidativo e caracteriza-se pela oxidação dos ácidos gordos das membranas celulares, originando peróxidos lipídicos

que, por sua vez, provocam a entrada e saída indiscriminada de metabolitos e, consequentemente, possível lise celular. Os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) são particularmente suscetíveis ao ataque por parte dos radicais livres comparativamente com os ácidos gordos monoinsaturados e saturados. A razão está relacionada com as ligações dos átomos de carbono, onde os PUFAs têm, no mínimo, duas ligações duplas enquanto os monoinsaturados e os saturados têm, respetivamente, uma ou nenhuma ligação dupla. Quando maior o número de ligações duplas de uma cadeia de ácidos gordos, maior a facilidade em perder um átomo de hidrogénio (186,187).

Inicialmente, as reações oxidativas podem acontecer apenas em um ácido gordo ou numa cadeia e propagar-se para as restantes cadeias adjacentes. Quando o ataque ocorre numa cadeia de ácidos gordos, o grupo metileno, que é muito reativo à oxidação, perde o átomo de hidrogénio e origina um radical de carbono centrado. Este último reage com o oxigénio formando os primeiros peróxidos lipídicos. A extensão da propagação depende da proporção de proteínas e lípidos membranares, a composição dos ácidos gordos e a concentração de antioxidantes (responsáveis por quebrar as reações em cadeia, doando o átomo de hidrogénio) (186–188,190).

A medição e quantificação da peroxidação lipídica nos animais implicam a determinação da perda dos ácidos gordos insaturados ou dos produtos primários ou secundários da peroxidação (187).

1.2.3. Sistema de transporte de eletrões

Para uma melhor compreensão dos ecossistemas marinhos e avaliar a sua integridade, foi preciso criar métodos de análise capazes de medir determinadas atividades biológicas da fauna e flora inseridas nos ambientes marinhos. Uma das bioatividades cruciais capazes de nos fornecer informações acerca do estado fisiológico de uma dada população ou comunidade é a estimativa da taxa metabólica e respiratória e a sua relação com o consumo de oxigénio (191,192).

Todos os seres eucariotas, vegetais ou animais, possuem estruturas especializadas para a obtenção de energia e necessitam de oxigénio para o normal funcionamento da célula ou organismo. As estruturas responsáveis pelos processos referidos são designadas

por mitocôndrias. Estes organelos, que possuem duas membranas, recebem o oxigênio e os derivados da glucose e transforma-os em moléculas de adenosina trifosfato ou ATP, que fornecem a energia necessária para o metabolismo celular, acumulando uma parte na forma de glicogênio (energia de reserva). Na membrana interna, a mitocôndria apresenta uma cadeia formada por complexos enzimáticos denominada por sistema de transporte de elétrons (ETS) ou, mais comum, cadeia respiratória. Na cadeia respiratória ocorre a fosforilação oxidativa, que converte as várias moléculas em ATP. Como demonstra a Figura 12, o ETS é composto por cinco complexos, quatro deles complexos proteico-lipídicos. Segundo Pereira *et al.* (2012), o complexo I ou NADH ubiquinona oxidoreductase, é o mais sensível, uma vez que existem inúmeras substâncias capazes de inibi-lo. O complexo II, também conhecido por succinato ubiquinona oxidoreductase, é o complexo menos estudado da cadeia respiratória. Já os complexos III e IV, citocromo c oxidoreductase e citocromo c oxidase, são os que provocam as lesões mais graves para o organismo no caso da inibição dos mesmos. O complexo III origina ROS uma vez que bloqueia a passagem dos elétrons para os complexos seguintes. O complexo IV, local onde ocorre a redução do oxigênio em água, provoca alterações nos gradientes eletroquímicos e, conseqüentemente, na permeabilidade membranar. O complexo IV é particularmente sensível ao ataque pelos xenobióticos. Por fim, o complexo V denominado ATP sintetase é o local onde o ADP origina ATP. Para além dos cinco complexos, a cadeia respiratória ainda apresenta dois transportadores de elétrons, a ubiquinona e o citocromo c que, em conjunto com os complexos II e IV, formam o sistema de fosforilação oxidativa (193,194).

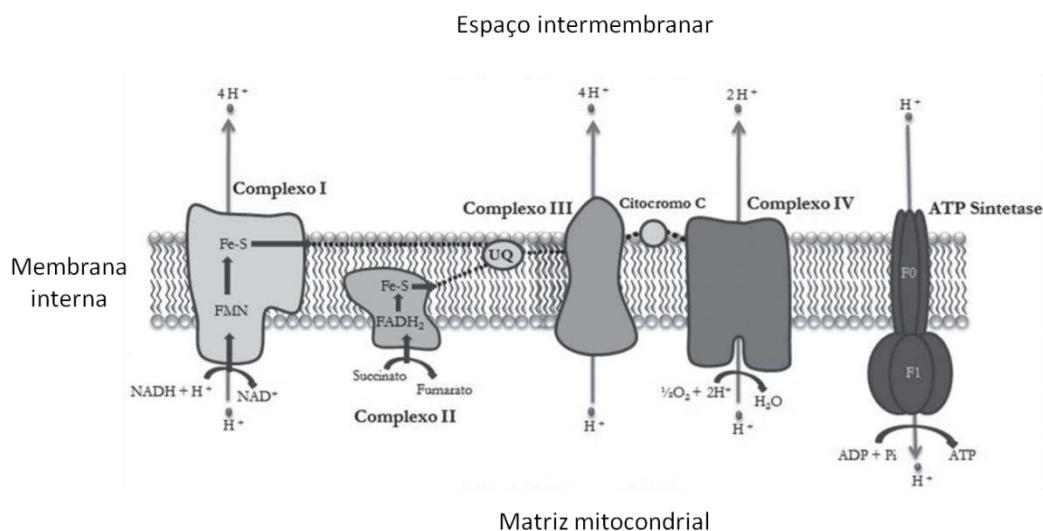


Figura 12: Sistema de transporte de elétrons na mitocôndria. Adaptado de Pereira *et al.* 2012 (193).

Os complexos I, III e IV funcionam como bombas de prótons, bombardeando prótons da matriz para o espaço inter-membranar da mitocôndria. Este trânsito provoca uma diferença de potencial utilizada posteriormente pela ATP sintetase como força motriz para a formação de ATP (193,194). Através da medição da atividade da ETS, é possível estimar a fração utilizada pelo organismo para a respiração e para a atividade metabólica. Em condições não stressantes para os indivíduos, a maioria da energia gerada na cadeia de transporte de elétrons é empregue na respiração. A ETS é o parâmetro estimativo da taxa respiratória dos organismos que mais se aproxima do valor real e apresenta uma correlação com o consumo de oxigénio *in vivo*. O método de determinação desta atividade é simples e sensível e, em condições ótimas, o valor determinado representa o limiar máximo da taxa respiratória para aquela espécie. As taxas respiratórias variam entre espécies, porém, também é observado uma dispersão dos valores da atividade da ETS intraespecífica (191,192,195,196).

Quando há alteração das condições ambientais ou a contaminação do ambiente e os organismos se encontram sob *stress*, eles ativam mecanismos de defesa de modo a combaterem as alterações fisiológicas que poderão sofrer (como o *stress* oxidativo). Por sua vez, esses mecanismos envolvem um grande gasto de energia e uma diminuição da massa corporal e das energias de reserva. Também a taxa respiratória é muito afetada, dado que há uma maior mobilização de ATP, formado na cadeia respiratória, para a atividade metabólica. Nas amêijoas, os estudos acerca das alterações da atividade da ETS na presença de xenobióticos, demonstram que, a curto prazo, este processo mantém-se

inalterado porém, quando expostas por um longo período de tempo, observam-se alterações na cadeia respiratória (7).

Capítulo IV- Métodos analíticos

1. Nota introdutória

Este capítulo tem por objetivo apresentar os vários métodos descritos na literatura para a monitorização dos vários compostos alvo deste trabalho, pertencentes a vários grupos, nomeadamente, nutrientes (água, matéria gorda, proteína, minerais), contaminantes (cafeína em águas) e biomarcadores (cafeína, acetilcolinesterase (AChE), a peroxidação lipídica (LPO) e o sistema de transporte de eletrões (ETS)).

Os métodos utilizados para a avaliação nutricional dos moluscos bivalves são métodos de referência, descritos em documentos oficiais (Norma Portuguesa, NP) ou em livros descritivos dos métodos validados por entidades oficiais, nomeadamente, os métodos da AOAC (Associação Oficial dos Químicos Analistas). Consequentemente, o equipamento, o material, os reagentes e as soluções, assim como as condições de operação estavam bem definidas e não foi necessário a sua seleção e/ou otimização.

Deste modo, este capítulo não discute os métodos selecionados, os quais serão apresentados na parte experimental.

2. Quantificação da cafeína

A preparação da amostra ou pré-tratamento é a primeira e uma das mais importantes etapas para a análise qualitativa e quantitativa de um fármaco ou outro xenobiótico numa matriz complexa. Nesta etapa são realizados os processos de limpeza da amostra e extração e concentração dos analitos de interesse (11). Segundo Luiz *et al.* (2015), as técnicas clássicas de pré-tratamento das amostras alimentares, como a extração líquido-líquido (LLE) e o Soxhlet têm sido recentemente substituídas por métodos automatizados, com menor tempo de análise e melhores para o ambiente, como a extração em fase sólida (SPE) (5) e a microextração em fase sólida (SPME) (197). Luiz *et al.* (2015) refere que para amostras de pescado, as melhores técnicas de concentração dos analitos e de limpeza de amostras de pescado, são a microextração em fase sólida “no tubo” (198), extração sortiva em barra de agitação (SBSE) (199), microextração em gota suspensa (SDME,) (200) e a microextração em fase líquida com fibras ocas (HF-LPME)) (201).

Acoplado aos vários métodos de pré-tratamento, estão diversas técnicas para a quantificação dos xenobióticos, maioritariamente cromatográficas, como a cromatografia líquida (LC) e cromatografia gasosa (GC) (11,202).

Independentemente do método cromatográfico, o detetor utilizado em ambos os métodos irá determinar a sensibilidade do método e, conseqüentemente, a capacidade de detectar e/ou quantificar os vários analitos em concentrações vestigiais ($\mu\text{g/g}$ ou ng/g). Silva e Collins (2011) afirmam que o método utilizado pode ser determinado segundo as propriedades físicas e químicas do composto ou grupo de compostos que pretendemos separar. Compostos voláteis e semi-voláteis apolares geralmente são separados por GC, contrariamente aos compostos analisados por HPLC que tendem a ser de reduzida volatilidade, alta polaridade ou composto com elevada instabilidade térmica. Os detetores associados a estes equipamentos com a finalidade de analisar qualitativa ou quantitativamente os vários poluentes nas diversas matrizes alimentares são os detetores UV-Vis (203–206) ou de espectrometria de massas (MS) (5,143,207). Normalmente, a cromatografia gasosa está associada ao detetor de massas, com menores limiares analíticos e a possibilidade de criar bibliotecas com inúmeros espectros de massa para comparação e confirmação dos compostos separados. Em HPLC, os detetores mais utilizados são o UV-Vis e a espectrometria de massa *tandem* (MS/MS), embora o primeiro tenha limites de deteção muito superiores ao segundo (17).

Na análise da cafeína em particular, De Maria e Moreira (2007) descrevem os métodos utilizados ao longo de várias décadas para a deteção e quantificação da cafeína em matrizes alimentares. Na década de 40 começaram a surgir os primeiros métodos oficiais adotados pela AOAC para a determinação de cafeína nos grãos de café (208). Primeiramente surgiu o método gravimétrico que, mais tarde, foi substituído pelo método de Bailey-Andrew (209). Inerente à morosidade e à falta de precisão e veracidade dos resultados, houve a necessidade de desenvolver outros métodos para a análise da cafeína. A espectrofotometria, já descrita há várias décadas, foi aperfeiçoada para alcançar melhor desempenho na análise deste composto (210), embora continuassem com baixa precisão. Na década de 60, começaram a ser publicados os primeiros trabalhos referentes à análise da cafeína em bebidas por cromatografia líquida. Mais tarde acoplaram estes dois métodos, que obtiveram resultados satisfatórios na análise da cafeína. Na década de 80, o método cromatográfico associado a um detetor UV-Vis foi

adotado como método oficial da AOAC (211). Durante todo este período foram estudados outros métodos para a determinação da cafeína nas matrizes alimentares. Um dos métodos promissores foi o GC associado a um detetor de ionização de chama. Strahl *et al.* (1977) utilizou este método para determinar a cafeína em amostras de chá e café, onde produziu resultados satisfatórios, demonstrando que o método de análise poderia ser utilizado para detetar cafeína em matrizes alimentares (212).

Mais tarde, na década de 90, a associação do HPLC-UV a uma coluna de fase reversa, permitiu reduzir substancialmente os limiares analíticos para a maioria dos analitos nas várias matrizes alimentares. Assim, para além da cromatografia gasosa, começou-se a utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência com detetor UV-Vis com uma coluna de fase reversa (HPLC-UV) na análise qualitativa e quantitativa da cafeína nos produtos alimentares, que demonstrou ser um método preciso, exato e de reduzido tempo de análise (148).

Outros autores têm apresentado métodos alternativos para a análise da cafeína, embora pouco utilizados, nomeadamente, a eletroforese capilar (213), a quimiometria (214), a espectroscopia de infravermelhos (215) e a eletroanálise (216).

Atualmente a cafeína é analisada em várias matrizes alimentares (206,217) e ambientais (205,218,219) por vários métodos. Nas matrizes alimentares há vários estudos nas amostras naturalmente com cafeína, nomeadamente, café (216), chá (206), chocolate (220), refrigerantes (220,221) e bebidas energéticas (222). Noutro tipo de produtos alimentares (água, vegetais, carne), a monitorização da cafeína deve-se à sua presença como contaminante, como é o caso dos produtos de pesca (5,143).

Goto *et al.* (1996) otimizaram as condições de extração e quantificação da cafeína e catequinas nas folhas de chá verde por HPLC-UV ($\lambda=274$ nm). O melhor solvente foi a água-acetonitrilo-ácido fosfórico num sistema de eluição em gradiente, com gamas de trabalho entre os 2 ng/L e os 2000 ng/L, e limite de deteção médio para todos os compostos na ordem dos 0,2 ng/L (206).

Seiler *et al.* (1999) realizou um estudo de ocorrência de cafeína e outros fármacos nas águas subterrâneas do Nevada, Estados Unidos da América. Devido a estudos anteriormente publicados que revelavam elevadas concentrações de cafeína nas águas

superficiais, os autores deduziram que a análise dos contaminantes por HPLC sem pré-tratamento da amostra seria o suficiente para detetar níveis de cafeína nas matrizes. O limite de detecção deste método foi de 5 µg/L, porém provou ser insuficiente para a correta e exata análise deste composto. Assim, foi necessário adotar outra técnica mais sensível à cafeína. Os autores optaram por realizar uma LLE como processo de extração e posterior análise por GS-MS, com limite de detecção de 0,04 µg/L (218).

Ferreira (2005) também analisou a cafeína das águas superficiais da Baía de Guanabara, Brasil. Para tal, realizou a LLE como pré-tratamento das amostras e, de seguida, foi determinar quantitativamente a cafeína das amostras através de HPLC-UV. Ferreira traçou a linearidade deste composto a um comprimento de onda de 285 nm, com gradiente de eluição de um solvente composto por água e metanol. A gama de trabalho utilizada foi entre 10 mg/L e 500 mg/L, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9999 e limite de detecção de 3 mg/L (205).

Reto *et al.* (2007) determinaram a cafeína e as catequinas em chá verde por SPME-HPLC-UV. A gama de trabalho para a cafeína foi de 75 mg/L a 500 mg/L, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,999 e limite de detecção e quantificação de 6,2 mg/L e 20 mg/L, respetivamente (223).

Perrone *et al.* (2008), realizou a validação da análise da cafeína e outros compostos presentes nos grãos de café por LC-MS. Os solventes que utilizou para determinar estes compostos foram água-ácido fórmico e metanol em gradiente de eluição. A gama de trabalho validade variou entre 0,05 mg/L e 25 mg/L, com R^2 de 0,9995 e LD e LQ de 11,9 µg/L e 39,6 µg/L respetivamente (217).

Sanson (2012), validou vários métodos para a análise de vários contaminantes das águas superficiais em diversas regiões do Brasil. Entre os contaminantes monitorizados, encontravam-se a cafeína e outros fármacos. Após vários ensaios, Sanson (2012), concluiu que o procedimento de extração, limpeza e concentração dos contaminantes assim como eliminação dos interferentes nas águas superficiais dos quais obteve melhores resultados foi o SPE associado ao GC/MS. Para a cafeína, composto de maior interesse no âmbito deste trabalho, a gama de trabalho utilizada foi de 5 µg/L a 200 µg/L com coeficiente de determinação (R^2) de 0,99, CVm =4% e limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método de 2,5 µg/L e 5 µg/L respetivamente (219).

Gaffney *et al.* (2014), validou o método de cromatografia líquida de ultra-eficiência associada à espectrometria de massa tandem (UPLC-MS/MS) para a análise de fármacos em águas após concentração por SPE. Para tal determinou o intervalo de linearidade de vários contaminantes, incluindo a cafeína. Esta demonstrou linearidade no intervalo de concentrações de 0,8 µg/L a 4,8 µg/L, com um R^2 de 0,9987 e LD e LQ de 0,1 µg/L e 0,36 µg/L, respetivamente (224).

Apenas nos últimos anos começaram a surgir mais estudos acerca do impacto provocado pelos contaminantes de natureza orgânica no ambiente marinho e na biota local. Os primeiros estudos em matrizes bióticas como os moluscos bivalves, surgiram apenas na última década, com o objetivo de estudar o impacto da poluição marinha nos mesmos. Contudo, os primeiros estudos acerca deste tema focavam-se na análise de fármacos, que não a cafeína, que poderia potencialmente provocar efeitos mais severos nos organismos. Estudos acerca da utilização de moluscos bivalves como biomonitores da poluição marinha e a análise de um largo espectro de contaminantes, incluindo a cafeína, nos tecidos destes organismos só surgiram anos mais tarde. Devido às matrizes bióticas apresentarem uma complexidade elevada, é necessário desenvolver processos de limpeza e extração que minimizem a perda de analitos durante as várias etapas de análise. Para matrizes bióticas, os processos mais utilizados são os ultrassons (200), extração micelar assistida por micro-ondas (MAME, “microwave-assisted micellar extraction”) e extração com líquido pressurizado (PLE, “presurized liquid extraction). Geralmente, estes processos antecederam a utilização de um segundo método de extração, a extração em fase sólida (SPE). Em alternativa aos métodos mencionados, também o QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method) e a extração acelerada por solvente (ASE) (220,225) são aplicados na análise de fármacos em várias matrizes, incluindo os moluscos bivalves.

Em 2008, Cueva-Mestanza *et al.* estudaram alternativas aos processos de extração convencionais em matrizes de moluscos bivalves, nomeadamente, mexilhões provenientes de Espanha. Analisou vários fármacos através de HPLC-UV, com gradiente de eluição, e o método de extração utilizado foi a MAME-SPE (226). A cafeína não se encontrava entre os compostos analisados.

À semelhança do estudo de Cueva-Mestanza *et al.* (2008) também McEneff *et al.* (2014) realizou o despiste de vários fármacos, no qual a cafeína não está incluída, em efluentes, águas marinhas e bivalves ao longo da costa irlandesa. Para a análise dos moluscos bivalves, empregou o PLE-SPE como método de limpeza e extração. De seguida, analisou as amostras em LC-MS/MS, em gradiente de eluição, e a fase móvel era composta por água e acetonitrilo (227).

Núñez *et al.* (2015), analisou sete fármacos em moluscos bivalves, nomeadamente amêijoas e mexilhões, provenientes de mercados locais de Espanha e França. O método utilizado pelos autores foi semelhante ao utilizado neste trabalho. O método de pré-tratamento dos bivalves foi o QuEChERS, com posterior análise por LC-MS/MS com gradiente de eluição. Mais uma vez, a cafeína não se encontrava entre os compostos analisados (228).

Em 2016, Capolupo *et al.* determinou a cafeína nos tecidos de mexilhões e nas águas dos locais de amostragem. Primeiramente, realizou um processo de extração de fase sólida (SPE) e posteriormente foi analisar ambas as amostras por LC-MS/MS. As amostras foram analisadas utilizando duas fases móveis, água-ácido fórmico e acetonitrilo-ácido fórmico. O intervalo linear do método para a análise da cafeína foi avaliado até aos 300 µg/L, com um R^2 de 0,99 e LD e LQ de 1,5 ng/L e 4,8 ng/L, respetivamente (5).

Recentemente, Dallarés *et al.* (2018) apresentaram um trabalho acerca da análise de contaminantes em moluscos bivalves (berbigão, mexilhão e lingueirão) e seu impacto no estado fisiológico dos organismos através da medição de vários biomarcadores. Para a quantificação de cafeína nas amostras de bivalves, primeiramente procederam ao processo de extração por QuEChERS-dSPE e, de seguida, analisaram as amostras por HPLC-MS (229).

Também Rodrigues *et al.* (2019), validaram uma metodologia para a determinação de inúmeros fármacos em amêijoas *Ruditapes decussatus*. Utilizaram como preparação da amostra o método QuEChERS e como método de análise o LC/MS-MS. No caso particular da cafeína, a fase móvel era constituída por dois solventes em gradiente de eluição (água-acetato de amónio-ácido fórmico e metanol). A gama de trabalho do método para a análise da cafeína é de 1,8 ng/g - 17 ng/g, com R^2 de 0,9958 e LD e LQ de 0,97 ng/g e 3,3 ng/g, respetivamente (143).

A Tabela 4 apresenta um resumo dos vários métodos aplicados à análise da cafeína em várias matrizes e respectivos limiares analíticos.

Tabela 4: Sumário das metodologias de análise da cafeína em várias matrizes ambientais e alimentares.

Matriz	Pré-tratamento	Método de análise	LD	LQ	Ref ^a
Águas subterrâneas	LLE	GS-MS	0,04 µg/L	0,13 µg/L	(218)
	SPE	LC-MS/MS, GrEI	1,5 ng/L	4,8 ng/L	(5)
Águas superficiais	LLE	HPLC-UV, GrEI	3,0 mg/L	10 mg/L	(205)
	SPE	GS-MS	2,5 µg/L	5,0 µg/L	(219)
Água para consumo humano	SPE	UPLC-ESI-MS/MS	0,1 µg/L	0,36 µg/L	(224)
Grãos de café	-	LC-MS, GrEI	11,9 µg/L	39,6 µg/L	(217)
Folhas de chá verde	-	HPLC-UV, GrEI	0,2 ng/L	2,0 ng/L	(206)
	SPME	HPLC-UV, GrEI	6,2 mg/L	20 mg/L	(223)
Mexilhões	SPE	LC-MS/MS, GrEI	1,5 ng/L	4,8 ng/L	(5)
Berbigões, mexilhões e lingueirões	QuEChERS-dSPE	HPLC-MS	-	-	(229)
Amêijoas	QuEChERS	LC-MS/MS, GrEI	0,97 ng/g	3,3 ng/g	(143)

GrEI – gradient de eluição

3. Biomarcadores de efeito

Atualmente, a responsabilidade ambiental é um tema muito discutido, cuja preocupação remonta ao final do século passado. As questões levantadas por parte da comunidade científica têm inquietado um número crescente de pessoas e comunidades acerca da saúde pública, da poluição dos ecossistemas e do esgotamento dos recursos

naturais. Por sua vez, a informação disponível que visa alertar o público acerca das medidas necessárias para minimizar o impacto negativo da atividade antropogénica nos ecossistemas terrestres e marinhos é cada vez maior. Com a crescente preocupação ambiental, foi necessário criar novas formas de avaliar e monitorizar o estado dos recursos naturais e das condições ambientais, nomeadamente, dos recursos hídricos. Assim, foi imperativo a seleção e desenvolvimento de medidas ecológicas e/ou biológicas ou indicadores que respondessem a fatores de *stress* ambiental e que, consequentemente, auxiliassem na monitorização dos ecossistemas marinhos.

Mundialmente e devido às suas características, os moluscos bivalves foram selecionados para avaliar a contaminação marinha. Nos anos 60 e 70, o norte da Europa e os Estados Unidos criaram um programa internacional de monitorização de bivalves (*International Mussel Watch Program*), que posteriormente originou programas de monitorização nacional como o Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves (SNMB). Nos anos 80, foi proposta a medição de respostas bioquímicas e fisiológicas individuais como indicadores do estado fisiológico das populações e comunidades de bivalves. Atualmente, essas medições são definidas como biomarcadores de efeito (230).

À medida que as técnicas de determinação dos biomarcadores foram evoluindo, também o próprio conceito de biomarcador evoluiu (Capítulo III). Atualmente, os biomarcadores são classificados como biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de suscetibilidade. Entre os biomarcadores de exposição encontram-se xenobióticos e/ou contaminantes ambientais, nomeadamente, a cafeína. No entanto, a cafeína pode ser considerada simultaneamente como um contaminante (por exemplo, nas várias matrizes alimentares e nas águas marinhas) ou um biomarcador de exposição dos moluscos bivalves ou outro organismo marinho exposto a um ambiente marinho sob exposição desse contaminante. Como a cafeína é um contaminante ambiental antes de se poder tornar um biomarcador de exposição, a apresentação dos vários métodos para a sua monitorização foi descrita na seção anterior, reservando esta seção aos biomarcadores de efeito.

3.1. Acetilcolinesterase (AChE)

Os pesticidas organofosforados e os carbamatos são conhecidos como anticolinérgicos, ou seja, inibidores da atividade das colinesterases. No final do século passado, a medição da atividade da AChE surgiu como uma ferramenta muito útil para monitorizar os efeitos de vários xenobióticos, principalmente pesticidas, no biota marinho. Por sua vez, começaram a surgir programas baseados numa abordagem a múltiplos biomarcadores, incluindo a AChE, nas quais são relacionadas as modificações enzimáticas dos organismos aquáticos com a contaminação dos ambientes marinhos. Porém, para estabelecer esta relação são necessários estudos prévios *in vitro* para criar bases bioquímicas e toxicológicas. Segundo Mora *et al.* (1999), nos anos 90 havia poucos estudos da atividade da AChE nos invertebrados marinhos, sendo a maioria dos estudos focados essencialmente em vertebrados e insetos (231).

Le Bris *et al.* (1995), realizaram um estudo acerca do efeito dos compostos organofosforados nas amêijoas e ostras. O ensaio foi realizado em laboratório, onde os indivíduos foram submetidos a diferentes concentrações destes compostos. Posteriormente, foram medidas as atividades enzimáticas, nomeadamente a AChE, no indivíduo total, no caso das amêijoas, e apenas nas brânquias, no caso das ostras. O processamento da amostra foi semelhante ao realizado neste trabalho e descrito mais à frente. A atividade enzimática foi medida de acordo com o método de Galgani e Bocquené (1988), sendo que a quantificação das proteínas foi determinada segundo o método de Bradford. A atividade da AChE foi expressa em $\text{U mg}^{-1} \text{ ww}$, onde U representa unidades de absorvência (232–234).

Em 1999, Mora *et al.* também estudou a atividade da acetilcolinesterase *in vitro* em amêijoas e mexilhões, face à exposição a dois inseticidas. O processamento dos tecidos foi semelhante ao realizado no presente trabalho e foi realizado na totalidade do organismo. Segundo Mora *et al.* (1999) a concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Lowri *et al.* (1951), adaptado por Shuel e Shuel (1967). Para a análise da atividade enzimática foi adotado o método de Ellman *et al.* (1961), no qual a atividade da AChE é expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ (231).

Dellali *et al.* (2001) realizou um estudo *in vivo* com amêijoas e mexilhões provenientes de uma lagoa do norte da Tunísia. O processamento das amostras realizou-se na

totalidade do indivíduo tal como realizado neste trabalho. A concentração de proteínas foi determinada segundo o método Bradford (1976) e a atividade enzimática através do método criado por Ellman *et al.* (1961). Este método de medição sofreu modificações, nomeadamente, o tempo de análise. O tempo de medição da atividade da AChE (30 minutos) foi selecionado baseado no método descrito por Galgani e Bocquené (1989). Também a AChE é expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ (183).

Binelli *et al.* (2006) afirmou que, embora já existissem alguns estudos acerca da utilização da AChE como biomarcador em organismos aquáticos, nomeadamente os moluscos bivalves, ainda eram escassos os estudos acerca de bivalves de água doce. Como tal, Binelli *et al.* (2006) realizaram um ensaio *in vitro* com mexilhões de água doce, no qual determinaram a resposta destes organismos quando expostos a vários contaminantes presentes nos ambientes marinhos através da medição da atividade da AChE. O processamento das amostras, à semelhança com os estudos anteriormente descritos, foi idêntico ao realizado no presente trabalho. A análise espectralométrica foi uma adaptação do método de Ellman *et al.* (1961), no qual o tempo de análise foi alterado (7 minutos). O método de Bradford (1976) foi utilizado para determinar o teor de proteína das amostras (235).

Em 2010, Amanullah *et al.* estudaram o efeito dos pesticidas organofosforados num molusco bivalve bentónico através da medição da atividade da AChE. O método de processamento da amostra foi diferente do utilizado neste trabalho, nomeadamente no tampão utilizado. A análise enzimática foi realizada nas brânquias, no músculo e no hepatopâncreas segundo o método descrito por Pilz (1965) (236).

Também Cravo *et al.* (2009, 2012) apresentaram dois estudos realizados relativos à atividade da AChE nas brânquias dos mexilhões e das amêijoas. No estudo de 2012, os autores monitorizaram mensalmente os valores da AChE nas amêijoas ao longo de um ano e meio. Em ambos os estudos, o método de análise adotado foi de Ellman *et al.* (1961), descrito por Cravo *et al.* (2009) e a atividade enzimática foi expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ (237,238). Este método foi o utilizado neste presente trabalho.

Souza (2016) realizou um estudo *in vivo* em que mediu a atividade da AChE vísceras e brânquias das ostras. O processamento das amostras foi idêntico ao realizado neste trabalho. O processo de análise adotado pelo autor foi o descrito por Ellman *et al.* (1961),

porém, também com a modificação no tempo de análise (3 minutos). A atividade da AChE foi expressa em mU mg⁻¹ prot e a determinação das proteínas foi baseada no método de Sedmack e Grossberg (1978) (239).

Na Tabela 5 encontram-se sumarizados os estudos acima descritos.

Tabela 5: Sumário de vários estudos realizados para a determinação da atividade da AChE.

Amostra	Tecido(s)	Natureza do estudo	Método de análise	Determinação da proteína	Fonte
Amêijoas	TO	<i>In vitro</i>	Galgani e Bocquené (1988)	Bradford (1976)	(229)
Ostras	Brânquias				
Amêijoas e mexilhões	TO	<i>In vitro</i>	Ellman <i>et al.</i> (1961)	Lowry <i>et al.</i> (1951), adaptado por Shuel e Shuel (1967)	(228)
Amêijoas e mexilhões	TO	<i>In vivo</i>	Adaptado de Ellman <i>et al.</i> (1961) e Galgani e Bocquené (1988)	Bradford (1976)	(180)
Mexilhões de água doce	TO	<i>In vitro</i>	Adaptado de Ellman <i>et al.</i> (1961)	Bradford (1976)	(232)
Moluscos bivalves bentônicos	Brânquias, músculo e hepatopâncreas	<i>In vitro</i>	Pilz (1965)	n.a	(233)
Mexilhões	Brânquias	<i>In vivo</i>	Adaptado de Ellman <i>et al.</i> (1961)	n.a	(235)
Amêijoas	Brânquias	<i>In vivo</i>	Adaptado de Ellman <i>et al.</i> (1961)	Lowry <i>et al.</i> (1951)	(234)
Ostras	Vísceras e brânquias	<i>In vivo</i>	Adaptado de Ellman <i>et al.</i> (1961)	Sedmack e Grossberg (1978)	(236)

TO- Totalidade do organismo; n.a- não aplicável.

3.2. Peroxidação lipídica (LPO)

A oxidação dos ácidos gordos provoca não só alterações químicas como alterações organoléticas, nomeadamente, o cheiro, o sabor característico a ranço, a cor ou a textura. Consequentemente, há várias décadas que estas alterações suscitam o interesse e atenção por parte da comunidade científica (240).

A reação química que ocorre entre as moléculas de oxigénio e os ácidos gordos foi caracterizada nos anos 40 por colaboradores de um laboratório de investigação inglês. Porém, apenas passado uma década é que a peroxidação lipídica se tornou um tema de interesse e investigação por parte dos ramos de biologia e medicina. Nos anos 50, foram realizados alguns estudos acerca da toxicidade dos hidrocarbonetos halogenados, nos quais foram evidenciados os efeitos tóxicos destes compostos através da estimulação da peroxidação lipídica. Consequentemente, desde essa altura até à atualidade, a peroxidação lipídica e outras reações de radicais livres em cadeia têm tido um papel importante na toxicologia, saúde humana e ecotoxicologia, uma vez que estas reações estão associadas à exposição a compostos tóxicos e à destruição ou dano dos tecidos, o que pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças (240).

Gutteridge e Halliwell (1990) afirmam que há diferentes estados da peroxidação lipídica que necessitam de diferentes técnicas de medição. A LPO pode ser medida através da quantificação da perda de ácidos gordos polinsaturados (PUFA), dos produtos primários da peroxidação ou dos produtos secundários como gases carbónicos e hidrocarbonetos. Inicialmente, a maioria dos ensaios realizados para quantificar a LPO recorriam a técnicas de cromatografia como o HPLC e o GC. No entanto, quando se tratava de misturas complexas, como as matrizes alimentares, era necessário desenvolver técnicas mais precisas e sensíveis aos produtos ou sub-produtos da peroxidação lipídica. Começou a utilizar-se o GC-MS, uma vez que, através da espectrometria de massa, as dados e a identificação dos compostos era mais precisa e exata. Os autores também enfatizam que a especificidade de um método de quantificação de LPO pode ser facilmente alcançada através da utilização de técnicas imunológicas, com anticorpos monoclonais específicos (240). Outro teste muito utilizado quando começaram a surgir as primeiras técnicas de quantificação da LPO era o teste TBA (ácido tiobarbitúrico), devido aos baixos custos e à sua simplicidade de utilização. O teste TBA consistia numa reação

colorimétrica que media a concentração de malonaldeído (MDA) por espectrofotometria a um comprimento de onda de 532 nm. Porém, este teste era pouco específico e, quando aplicado a sistemas não membranares como fluidos corporais, produziam resultados pouco precisos (187).

Contudo, o MDA continuou a ser considerado um bom modelo para detectar e quantificar a peroxidação lipídica nos sistemas biológicos e alimentares (241).

Em 1991, Viarengo *et al.* quantificou a peroxidação lipídica na glândula digestiva dos mexilhões. O processamento prévio da amostra foi semelhante ao realizado no presente trabalho porém, a análise da LPO, foi determinada por HPLC, através da quantificação de MDA. O método de análise foi descrito por Esterbauer *et al.* (1984) (242).

Uns anos mais tarde, Labrot *et al.* (1996) realizaram um ensaio *in vitro* onde submeteram peixes e amêijoas a determinadas concentrações de vários metais pesados e avaliaram as respostas dos organismos através da medição de biomarcadores como a LPO. O processamento das amostras foi semelhante ao utilizado neste trabalho e descrito no capítulo seguinte. O método de análise descrito por Livingstone *et al.* (1990) foi o selecionado para determinar a peroxidação lipídica através da formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico e quantificada por equivalentes de MDA. O método para a determinação da proteína foi o descrito por Lowry *et al.* (1951) e adaptado por Shuel e Shuel (1967) (243).

Geret *et al.* (2003) apresentaram um ensaio *in vivo* que quantificaram a atividade de várias enzimas em amêijoas recolhidas da Ria Formosa (Portugal). Para isso, separou as brânquias e a glândula digestiva de cada organismo para posterior processamento das amostras. Para cada um dos tecidos, homogeneizou com tampão Tris a pH 7,6 e posterior centrifugação e análise do sobrenadante. A quantificação da LPO foi realizada segundo o método descrito por Erdelmeier *et al.* (1998), com incubação durante 1 hora a 45 °C e posterior leitura a 586 nm. A LPO foi expressa em nmol MDA g⁻¹ prot com auxílio da curva de calibração de MDA. O teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951) (244).

Também Zannete *et al.* (2006) realizou um estudo *in vivo* no qual mediu a peroxidação lipídica nas brânquias das ostras. O processamento das brânquias, após dissecação, foi idêntico ao utilizado por Geret *et al.* (2003) contudo o método de análise foi o descrito

por Hermes-Lima *et al.* (1995) e adaptado por Monserrate *et al.* (2003) para invertebrados. Este método difere do utilizado no presente trabalho essencialmente na solução tampão, no tempo e temperatura de incubação e no comprimento de onda onde são lidas as amostras. O método utilizado por Zannete *et al.* (2006) ao invés de quantificar MDA como a maioria dos estudos, quantifica o hidroperóxido de cumeno (CHP). Consequentemente, a LPO é expressa em nmol CHP g⁻¹ ww recorrendo à curva de calibração de CHP (189).

Em 2011, foi realizado outro estudo *in vivo* ao longo da costa algarvia. Almeida *et al.* (2012) quantificaram, entre outros biomarcadores, a LPO nas brânquias de mexilhões. O método de análise adotado pelos autores foi o de Erdelmeier *et al.* (1998), onde o MDA foi utilizado como padrão externo. A LPO foi expressa em µmol g⁻¹ prot e o teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951) (245).

Também no mesmo ano, Ahmad *et al.* (2011) analisaram lambujinhas que estavam expostas a descargas de mercúrio na zona da Ria de Aveiro. Após a amostragem, fez-se o processamento dos tecidos dos indivíduos na totalidade do organismo, nas brânquias e na glândula digestiva. Este processo foi semelhante ao realizado neste trabalho e descrito mais à frente. Os autores quantificaram a LPO através do método descrito por Ohkawa *et al.* (1979) e Bird e Draper (1984), com ligeiras modificações. As amostras foram lidas a 535 nm e a LPO foi expressa em µM de substâncias reativas de TBA mg⁻¹ prot. O teor de proteína foi determinado pelo método de Biuret descrito por Gornall *et al.* (1949) (246).

Cravo *et al.* (2012) efetuaram um estudo na Ria Formosa, no qual recolheram mensalmente amêijoas e determinaram a atividade de vários biomarcadores. Para a peroxidação lipídica, dissecaram as brânquias dos organismos que foram analisadas segundo o método descrito por Erdelmeier *et al.* (1998). A LPO foi expressa em nmol g⁻¹ prot e o teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando reagente de Folin (237).

Na Tabela 6 encontram-se sumarizados os estudos acima descritos.

Tabela 6: Sumário de vários estudos realizados para a determinação da LPO.

Amostra	Tecido(s)	Natureza do estudo	Método de análise	Determinação da proteína	Fonte
Mexilhões	GD	<i>In vivo</i>	Esterbauer <i>et al.</i> (1984)	n.a	(242)
Amêijoas	TO	<i>In vitro</i>	Livingstone <i>et al.</i> (1990)	Lowri <i>et al.</i> (1951), adaptado por Shuel e Shuel (1967)	(243)
Amêijoas	GD e brânquias	<i>In vivo</i>	Erdelmeier <i>et al.</i> (1998)	Lowri <i>et al.</i> (1951)	(244)
Ostra	Brânquias	<i>In vivo</i>	Hermes-Lima <i>et al.</i> (1995), adaptado por Monserrate <i>et al.</i> (2003)	n.a	(189)
Mexilhões	Brânquias	<i>In vivo</i>	Erdelmeier <i>et al.</i> (1998)	Lowri <i>et al.</i> (1951)	(245)
Lambujinhas	Brânquias, GD e TD	<i>In vivo</i>	Adaptado de Ohkawa <i>et al.</i> (1979) e Bird e Draper (1984)	Método de Biuret (Gornall <i>et al.</i> , 1949)	(246)
Amêijoas	Brânquias	<i>In vivo</i>	Erdelmeier <i>et al.</i> (1998)	Lowri <i>et al.</i> (1951)	(237)

GD- Glândula digestiva; TO- Totalidade do organismo; n.a- Não aplicável.

3.3. Sistema de transporte de eletrões (ETS)

Os primeiros estudos acerca da taxa de respiração e da atividade metabólica da fauna marinha surgiram em plâncton. Até 1970, os métodos desenvolvidos para a determinação da taxa respiratória não reportavam resultados viáveis. Segundo King e Packard (1975) não existiam métodos diretos rápidos que fossem capazes de calcular a taxa respiratória natural das comunidades de fitoplâncton e zooplâncton e os métodos indiretos existentes eram morosos, insensíveis e pouco exatos. Nessa altura, a taxa respiratória era medida através de índices facilmente calculados, como o ATP, contudo os métodos não estavam desenvolvidos o suficiente para que os estudos *in vitro* fossem capazes de prever as taxas respiratórias *in vivo*. Consequentemente, foi necessário desenvolver técnicas nas quais se estabelecesse algum tipo de extrapolação ou correlação para que os resultados obtidos se aproximassem dos valores respiratórios *in vivo*. Foi descoberta uma correlação entre a respiração e a atividade do succinato desidrogenase (SDH). No entanto, devido à falta de sensibilidade dos ensaios desenvolvidos para a medição desta atividade, a técnica foi excluída dos métodos para a determinação da taxa respiratória do plâncton. A quantificação da atividade da ETS, de acordo com King e Packard (1975), era utilizada para estimar a taxa respiratória do plâncton e dos organismos bentónicos. Este é um método simples e sensível que fornece resultados mais próximos dos reais, uma vez que o sistema de transporte de eletrões está fortemente relacionado com o consumo de oxigénio. King e Packard (1975) modificaram o método de quantificação da taxa de respiração através da medição da atividade do ETS, primeiramente descrito por Packard (1975), e adaptaram-no para 15 espécies de zooplâncton (192). No entanto, este método não conseguia prever a taxa respiratória das comunidades *in vivo*, uma vez que a resposta dos organismos, face às alterações dos fatores ambientais, era imediata para o consumo de oxigénio, contrariamente à atividade da ETS, que apresentava uma resposta mais lenta, podendo demorar semanas até que o organismo produza uma resposta de adaptação às alterações. Assim, de acordo com Bamstedt (1980), Owens e King (1975) modificaram o método anteriormente desenvolvido por King e Packard (1975), onde incluíram um fator de conversão da atividade da ETS para a taxa respiratória *in vivo* do zooplâncton marinho (196).

Maki e Remsen (1981) e Peele e Colwell (1981) referem dois métodos diretos muito utilizados para a determinação da atividade bacteriana através da cadeia de transporte

de eletrões. O primeiro envolve a formação de cristais de formazana que são observados através de microscopia de fluorescência. O segundo necessita de uma incubação da amostra com extrato de levedura e ácido nalidíxico. Esta reação vai impedir a divisão celular das células ativas que, por sua vez, vão continuar a crescer, tornar-se alongadas e produzir um composto laranja, distinguível através de microscopia de fluorescência (247,248).

Nos anos 90, após o desenvolvimento de algumas técnicas de quantificação da energia gasta na respiração ou da libertação de carbono por diferentes organismos, Cammen *et al.* (1990) sumariza e aponta as falhas dos métodos desenvolvidos para os invertebrados marinhos até à data. Os métodos usualmente utilizados incluíam: (1) a medição do consumo de oxigénio para estimar a quantidade de dióxido de carbono libertado, aplicando um fator de conversão, (2) a datação radiométrica de carbono e medição do dióxido de carbono datado que foi libertado para a água, (3) métodos calorimétricos que medem diretamente o calor metabólico produzido pelos indivíduos e (4) a monitorização da perda de massa corporal em indivíduos privados de alimentação, durante um determinado período de tempo, e a sua extrapolação para a taxa de perda corporal no início da privação de alimento. Todos estes métodos foram questionáveis uma vez que foram realizados em laboratório, em vez de realizados no ambiente natural dos organismos. Para além das condições ambientais não serem totalmente mimetizadas em laboratório, outros estímulos ou fatores não eram possíveis de simular laboratorialmente como as interações com outros indivíduos da comunidade, a qualidade da água ou as marés. Na década de 80 foram realizados vários estudos para a medição da atividade do ETS em várias espécies, nos quais se constatou que o fator de correlação determinado inicialmente por Owens e King (1975) não poderia ser aplicado a todas as espécies. Por sua vez, foi necessário determinar a relação atividade enzimática da ETS/taxa respiratória (medida através da quantificação direta do consumo de oxigénio) para cada espécie sob condições controladas em laboratório (249).

Posto isto, Cammen *et al.* (1990) avaliou a eficácia da quantificação da atividade da ETS em poliquetas e anfípodes e a sua extrapolação para as taxas de respiração *in vivo*. Para tal, adotou o método descrito por Owens e King (1975), em que a ETS é expressa em $\mu\text{L O}_2 \text{ h}^{-1}$. Os autores concluíram que a atividade da ETS poderia ser utilizada como

ferramenta para estimar a atividade metabólica da macrofauna marinha a longo prazo (249).

Madon *et al.* (1998), estudaram a atividade da ETS em mexilhões de água doce (zebra mussels). Primeiramente, estabeleceram a relação atividade enzimática da ETS/ taxa respiratória para estes organismos. De seguida, quantificaram a atividade enzimática segundo o método Owens e King (1975), com algumas modificações. As alterações ao método original incluíram um aumento dos volumes de amostra e reagentes e da concentração de NADH, a eliminação do NADPH como substrato e a utilização da diferença do incremento de absorvências para obtenção de resultados mais precisos. As amostras foram lidas por espectrofotometria, a 490 nm, a cada 30 segundos durante 2 minutos. A atividade enzimática da ETS foi expressa em $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ ww h}^{-1}$ e $\text{mg O}_2/\text{indivíduo/h}$ (250).

Também Fanslow *et al.* (2001), realizaram um estudo em que mensalmente recolheram mexilhões de água doce e quantificaram a atividade enzimática da ETS. O método adotado pelos autores foi o descrito por Owens e King (1975), em que atividade da ETS foi determinada espectrofotometricamente a 490 nm e foi expressa em $\mu\text{g O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ dw h}^{-1}$ (251).

Simčič e Brancelj (2004) realizaram ensaios *in vitro* em dois híbridos de *Daphnia* (pertencente ao sub-filo crustacea), no qual mediram a atividade da ETS e a respetiva taxa respiratória. O processamento das amostras foi idêntico ao utilizado no presente trabalho e descrito no capítulo seguinte e, sumariamente, consistiu na homogeneização com um tampão específico, posterior centrifugação e a análise do sobrenadante. O método utilizado para a determinação da atividade enzimática da ETS foi o descrito por Owens e King (1975) e adaptado por G.-Tóth (1999). As amostras foram analisadas por espectrofotometria, a um comprimento de onda de 490 nm, e a atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{L O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ dw h}^{-1}$ (252).

Recentemente, foi apresentado um estudo laboratorial por Cruz *et al.* (2016) no qual analisaram vários biomarcadores em amêijoas expostas a concentrações crescentes de cafeína. Um dos biomarcadores avaliados foi a ETS. O processamento das amostras foi semelhante ao realizado neste trabalho, assim como ao de Simčič e Brancelj (2004). A atividade enzimática foi determinada segundo o método de King e Packard (1975) e

adaptado por Coen e Janssen (1997). As amostras foram analisadas através de espectrofotometria, a 490 nm, a cada 25 segundos durante 10 minutos. A atividade da ETS foi expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ww}$ (7).

Em 2018, Yussepone *et al.* realizaram um ensaio em laboratório, onde expuseram mexilhões de água doce a condições de hipoxia e anoxia durante um determinado período de tempo. De seguida, determinaram a atividade de várias enzimas, incluindo a atividade da ETS. O processamento das amostras realizou-se no manto dos mexilhões, sendo que o processo de homogeneização e centrifugação foi semelhante ao utilizado no presente trabalho. O método adotado foi o descrito por Chatelain *et al.* (2008), no qual utilizaram um leitor de microplacas e analisaram as amostras a um comprimento de onda de 490 nm e uma temperatura de 10 °C. A atividade da ETS foi expressa em U ETS $\text{g}^{-1} \text{ww}$ (253).

Na Tabela 7 encontram-se sumarizados os estudos acima descritos.

Tabela 7: Sumário de vários estudos realizados para a determinação da atividade da ETS.

Amostra	Tecido(s)	Natureza do estudo	Método de análise	Fonte
Poliquetas e anfípodes	TO	<i>In vitro</i>	Owens e King (1975)	(249)
Mexilhões de água doce	TO	<i>In vivo</i>	Adaptado de Owens e King (1975)	(250)
Mexilhões de água doce	TO	<i>In vivo</i>	Owens e King (1975)	(251)
<i>Daphnia</i> (crustáceo)	TO	<i>In vitro</i>	Owens e King (1975), adaptado por G.-Tóth (1999)	(252)
Amêijoas	TO	<i>In vitro</i>	King e Packard (1975) e adaptado por Coen e Janssen (1997)	(7)
Mexilhões de água doce	Manto	<i>In vitro</i>	Chatelain <i>et al.</i> (2008)	(253)

TO- Totalidade do organismo.

Capítulo V- Parte experimental

1. Equipamento e material

Nesta secção, o equipamento e material utilizado na análise dos vários parâmetros (nutricionais, bioquímicos, ambientais e cafeína) estão numa só secção, ou seja, não estão separados por parâmetro ou metodologia de análise. Em alguns equipamentos e materiais, adicionalmente, estão descritas algumas especificações dos mesmos.

1.1. Equipamento

- Balança analítica AB204-S $\pm 0,5$ mg, Mettler Toledo
- Balança de precisão PCB, Kern
- Banho ultrassons, VWR
- Centrifuga 2K15, Sigma Laborzentrifugen
- Craveira digital 150 mm, Peclise
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Beckman, equipado com:
 - Detetor UV/Vis, System Gold 166, Beckman Coulter
 - Módulo de solvente programável, sistema de 2 bombas programáveis (A e B), System Gold 126, Beckman
 - Coluna cromatográfica, C18, 125 mm \times 4 mm \times 0,5 μ m, Merck
 - Loop de 50 μ L
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência associado à espectrometria de massa *tandem* (HPLC-MS/MS), Dionex Ultimate 3000 system, Thermo Scientific, equipado com:
 - Bomba binária, injetor automático e forno de temperatura
 - Coluna cromatográfica, C18, Kinetex EVO 2,1 mm \times 50 mm \times 2,6 μ m, Phenomenex
 - Espectrómetro de massa de triplo quadrupolo, TSQ Endura, Thermo Scientific
- Destilador automático UDK 132 230V, Velp Scientifica
- Digestor Kjeldahl, Bloc Digest 6, J.P.Selecta
- Espectrofotómetro U-2000 UV-Visível, Hitachi
- Estufa, Memmert
- Evaporador rotativo Laborota 4001, Heidolph

- Homogenizador Ultra Turrax, Tube Drive Control, IKA
- Incubadora, Heraeus
- Manta de aquecimento Fibroman-C, J.P. Selecta
- Microcentrifuga Z 100M, Hermle
- Mufla, Heraeus Hanau
- Placa de aquecimento digital 04644-Series, Cole Parmer Instrument Company
- Placa de aquecimento equipada com sonda de temperatura externa, Bibby Sterilin
- Potenciômetro equipado com eletrodo de vidro e sonda de compensação automática de temperatura GPL 22, Crison
- Sistema de evaporação/concentração de amostras, Turbovap Classic LV, Biotage
- Sistema automático de extração em fase sólida (SPE), modelo Autotrace 280, Thermo Scientific Dionex
- Sistema de obtenção de água ultra-pura, sistema de osmose inversa, modelo Rios 16, Millipore
- Sistema de obtenção de água desmineralizada (condutividade < 2,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ @ 20 °C), desionizador de leite misto, Desmiwater.
- Sonda multiparamétrica (temperatura, salinidade, pH e oxigênio), YSI 6820
- Trituradora Ft1725, Electric Co
- Vortex 2000, Heidolph Reax

1.2. Material

Nesta secção está apenas especificado o material específico para o trabalho desenvolvido no âmbito desta tese e não se faz referência ao material de uso corrente em laboratório.

- Bureta 50 mL \pm 0,05 mL, Linex
- Cartucho de extração em fase sólida (SPE), Oasis HLB, 6 mL, 200 mg, Waters
- Cartucho de extração por Soxhlet, 30 mm \times 100 mm, Macherey- Nagel
- Células de quartzo, 3 mL, com percurso ótico de 1 cm, Labbox
- Células de vidro, 2 mL, com percurso ótico de 5 mm, Labbox
- Eppendorfs, 2 mL, Brand

- Filtro de membrana de celulose 0,45 μm \times 4,5 cm, MF-Millipore
- Filtros de seringa, 0,45 μm \times 13 mm, Kinesis
- Micropipeta de 5000 μL , I@lab Equipamentos de Laboratório
- Micropipetas de 100 μL e 1000 μL , Labnet BioPette
- Micropipetas de 200 μL e 1000 μL , Gilson
- Microseringa exmire, 50 μL , ITO Corporation
- Papel de filtro qualitativo \varnothing 240 mm, Filter-Lab
- Sistema de extração e limpeza, QuEChERS, Thermo Scientific, constituído por:
 - Cartuchos para dSPE, mistura de MgSO_4 (6 g) e $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (1,5 g),
 - Cartuchos de limpeza, mistura de MgSO_4 (900 mg), PSA (300 mg) & C18 (150 mg)
- Sistema para extração Soxhlet equipado com balão de fundo redondo de 500 mL, extrator de Soxhlet e condensador de 3 bolas, Pyrex Wulkex
- Tubos Kjeldahl, série macro, 250 mL, graduados a 100 mL, \varnothing 42 mm \times 300 mm, Selecta
- Vials de vidro borosilicato, formato champagne, âmbar, 1,1 mL, com tampas de rosca de polipropileno (azul), 9 mm e septos de PTFE/silicone, pre-perfurados, GCPL (Godrej Consumer Products Limited)
- Vials de vidro borosilicato âmbar, 19 mm \times 32 mm, com tampas de rosca de polipropileno e septos de silicone, Presilt, Waters

2. Reagentes e soluções

2.1. Reagentes gerais

- Acetato de sódio anidro, CH_3COONa , ACS- *p.a.* (Reag. Ph. Eur.) 99%, Panreac
- Acetilcolina, $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{INOS}$, > 98%, Tokyo Chemical Industry
- Acetonitrilo, CH_3CN , para HPLC \geq 99,9%, J.T. Baker
- Acetonitrilo, CH_3CN , para HPLC 99,9%, Carlo Erba Reagenti
- Ácido 5,5'- ditio-bis-(2-nitrobenzóico), $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$, 99%, ACROS Organics
- Ácido acético glacial, CH_3COOH , *p.a.* (Reag. Ph. Eur.) 99-100%, Chem-Lab
- Ácido bórico, H_2BO_3 , \geq 99,8%, Chem-Lab
- Ácido clorídrico, HCl , puriss. *p.a.* 37%, Honeywell Fluka
- Ácido metanossulfónico, $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, técnico (reagente geral), BDH Chemicals, VWR
- Ácido orto-fosfórico, H_3PO_4 , 85%, Panreac
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 1 N, , ampola Titrizol, Fluka Analytical
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 , puriss. *p.a.* 95-97%, Honeywell Fluka
- Água desmineralizada

- Água ultra-pura
- Areia do mar lavada (grão fino, <0,3 mm), SiO₂, José Manuel Gomes dos Santos
- Azul de metileno, C₁₆H₁₈ClN₃S, BDH Chemicals
- Cloreto de sódio, NaCl, *p.a* 99,5%, Panreac
- Dihidrogenofosfato de sódio dihidratado, NaH₂PO₄·2H₂O, *p.a* (Reag. Ph. Eur.), Merck
- n-Hexano, C₆H₁₄, ≥ 95%, Fisher Chemical
- Hidrogenofosfato de sódio dihidratado, Na₂HPO₄·2H₂O, *p.a* 99,5%, Merck
- Hidróxido de sódio lentilhas, NaOH, Eka
- 5-Hidroximetil-2- furaldeído, C₆H₆O₃, 97%, Alfa Aesar
- Hidroxitolueno butilado, C₁₅H₂₄O, ≥ 99%, Sigma-Aldrich
- Iodonitrotetrazolium, C₁₉H₁₃ClIN₅O₂, 98%, ACROS Organics
- Metanol, CH₄O, 99,8%, Riedel-de-Haën
- Metanol, CH₄O, para HPLC ≥ 99,9%, Honeywell, Riedel-de-Haën
- 1-Metil-2-fenilindol, C₁₅H₁₃N, 99%, Alfa Aesar
- Pastilhas catalizadoras kjeldahl, 6,25% em CuSO₄·5H₂O, Panreac AppliChem, ITW Reagents
- Polivinilpirrolidona seco, C₆H₉ON, técnico, BDH PROLABO, VWR Chemicals
- Reagente de Bradford, Thermo Scientific
- Sal disódico de NADH C₂₁H₂₇N₇Na₂O₁₄P₂, ≥ 95%, Panreac AppliChem, ITW Reagents
- Sal tetrasódico de NADPH, C₂₁H₂₆N₇Na₄O₁₇P₃, ≥ 95%, Panreac AppliChem, ITW Reagents
- Solução tamponada de formalina 10%, BDH PROLABO, VWR
- Sulfato de magnésio, MgSO₄·7H₂O, ACS- *p.a* 99,5%, Carlo Erba Reagenti
- Tetrahidrofurano, C₄H₈O, 99,9%, BDH PROLABO, VWR Chemicals
- Tris(hidroximetil)- aminometano, C₄H₁₁NO₃, > 99%, Fisher Chemical
- Triton X-100 (Proteomics), C₃₄H₆₂O₄, Life Science Amresco, VWR
- Vermelho de metilo, C₁₅H₁₅N₃O₂, Carlo Erba Reagenti
- Cafeína, C₈H₁₀N₄O₂, Sigma Chemical
- L-Fenilalanina, C₉H₁₁NO₂, 98,5%, Acros Organics
- Malonaldeído-bis-(dimetil acetal) ou 1,1,3,3-tetrametoxipropano, C₇H₁₆O₄, para síntese ≥ 97%, Merck
- Solução tampão pH = 4,00 @ 20 °C, Crison
- Solução tampão pH = 7,00 @ 20 °C, Crison
- Solução tampão pH = 4,00 @ 20 °C, Merck
- Solução tampão pH = 6,00 @ 20 °C, Fisher
- Solução tampão pH = 6,8 @ 20 °C, Carlo Erba Reagents

2.2. Soluções

2.2.1. Caracterização nutricional

As soluções para a caracterização nutricional dos bivalves foram preparadas de acordo com as especificações dos métodos de referência, normas portuguesas (NP) ou métodos oficiais da Associação Oficial de Químicos Analistas AOAC, *Association of Official Analytical Chemists*, associadas a cada determinação.

Nesta seção apenas serão descritas as soluções utilizadas, remetendo-se a sua preparação para a respetiva norma ou método oficial.

2.2.1.1. Proteína

A proteína foi determinada pelo método Kjeldahl, método AOAC 928.08 (254).

- Solução de hidróxido de sódio, NaOH 40%
- Solução de ácido bórico, H_3BO_3 a 4% (V/V)
- Solução titulante de ácido sulfúrico, H_2SO_4 0,1 N
- Solução indicadora de Kjeldahl

2.2.1.2. Matéria gorda total

A matéria gorda foi determinada pelo método gravimétrico, método AOAC 960.39 (254).

- Solução de ácido clorídrico, HCl 4 N

2.2.2. Indicadores de contaminação – análise da cafeína

2.2.2.1. Padrões de cafeína

Todas as soluções de cafeína foram armazenadas ao abrigo da luz e a - 4 °C (em metanol) ou a 4 °C (em fase móvel).

Solução mãe de cafeína (CAF), 800 mg/L

Dissolver 0,0200 g de cafeína para um balão volumétrico de 25 mL e perfazer o volume com metanol.

Solução intermédia I de cafeína, 358 mg/L

Diluir 2,24 mL da solução mãe de cafeína para 5 mL com fase móvel.

Solução intermédia II de cafeína, 60 mg/L

Diluir 3,75 mL da solução mãe de cafeína para 50 mL com metanol.

Solução intermédia III de cafeína, 20 mg/L

Diluir 5 mL da solução intermédia II de cafeína para 15 mL com metanol.

Solução intermédia IV de cafeína, 10 mg/L

Diluir 830 µL da solução intermédia II de cafeína para 5 mL com fase móvel.

Solução intermédia V de cafeína, 5 mg/L

Diluir 2,5 mL da solução intermédia IV de cafeína para 5 mL com fase móvel.

Solução intermédia VI de cafeína, 1 mg/L

Diluir 0,5 mL da solução intermédia III de cafeína para 10 mL com fase móvel.

Solução intermédia VII de cafeína, 0,5 mg/L

Diluir 0,25 mL da solução intermédia III de cafeína para 10 mL com fase móvel.

Solução intermédia VIII de cafeína, 0,1 mg/L

Diluir 0,2 mL da solução intermédia V de cafeína para 10 mL com fase móvel.

2.2.2.2. Surrogate ou padrão interno de extração (5'-Hidroximetil-2'-furaldeído, HMF)

Todas as soluções de HMF foram armazenadas ao abrigo da luz e a - 4 °C (em metanol) ou a 4 °C (em fase móvel).

Solução mãe de HMF, 4000 mg/L

Dissolver 0,1000 g de cafeína para um balão volumétrico de 25 mL e perfazer o volume com metanol.

Solução intermédia I de HMF, 1000 mg/L

Diluir 1,25 mL da solução mãe de HMF para 5 mL com metanol ou fase móvel.

Solução intermédia II de HMF, 50 mg/L

Diluir 500 µL da solução intermédia I de HMF para 10 mL com fase móvel.

2.2.2.3. Soluções padrão de cafeína para o estudo de linearidade

A partir da solução mãe de cafeína e das soluções intermédias de cafeína III a VIII (secção 2.2.2.1) foram preparadas 26 soluções padrão de concentrações compreendidas entre 0,005 mg/L e 60 mg/L (Tabela 8). As soluções padrão foram preparadas em fase móvel e em balão volumétrico de 10 mL.

Tabela 8: Preparação das soluções padrão de cafeína para o estudo da linearidade.

Soluções	Concentração (mg/L)	Volume (mL)	Solução padrão (mg/L)
Solução mãe	800	0,750	60
		0,690	55
		0,630	50
		0,560	45
		0,500	40
		0,440	35
		0,380	30
		0,310	25
		0,250	20
Sol Inter III	20	7,50	15
		5,00	10
		3,75	7,5
		2,50	5,0
		1,25	2,5
		0,500	1,0
		0,350	0,70
		0,250	0,50
Sol Inter IV	10	0,250	0,25
		0,300	0,15
Sol Inter V	5,0	0,200	0,10
		0,140	0,070
		0,100	0,050
		0,250	0,025
Sol Inter VI	1,0	0,150	0,015
		0,200	0,010
Sol Inter VII	0,50	0,200	0,010
Sol Inter VIII	0,10	0,500	0,0050

2.2.2.4. Soluções padrão para a reta de calibração de cafeína

A partir da solução mãe de cafeína e das soluções intermédias de cafeína II e III (secção 2.2.2.1) foram preparadas 12, 9 e 13 soluções padrão para as várias gamas de trabalho, baixa (0,5 mg/L a 2,4 mg/L), intermédia (4 mg/L a 20 mg/L) e alta (23 mg/L a 60 mg/L), respetivamente. As soluções padrão foram preparadas em fase móvel e em balões volumétricos de 10 mL. A preparação das soluções está descrita na Tabela 9.

Tabela 9: Preparação das soluções padrão de cafeína para a curva de calibração nas três gamas de trabalho.

Soluções	Concentração (mg/L)	Volume (mL)	Solução padrão (mg/L)
GA			
Solução mãe	800	0,75	60
		0,71	57
		0,66	53
		0,63	50
		0,59	47
		0,54	43
		0,50	40
		0,46	37
		0,41	33
		0,38	30
		0,34	27
		0,29	23
Glm			
Sol Inter II	60	3,3	20
		3,0	18
		2,7	16
		2,3	14
		2,0	12
		1,7	10
		1,3	8,0
		1,0	6,0
		0,7	4,0
GB			
Sol Inter III	20	1,20	2,40
		1,13	2,25
		1,00	2,00
		0,88	1,75
		0,75	1,50
		0,63	1,25
		0,50	1,00
		0,45	0,90
		0,40	0,80
		0,35	0,70
		0,30	0,60
		0,25	0,50

2.2.2.5. Soluções de controlo cromatográfico

Solução padrão de controlo de cafeína, 2,4 mg/L

Diluir 0,2 mL de solução intermédia II de cafeína para 5 mL com fase móvel.

Solução padrão de controlo de cafeína e HMF, 0,5 mg/L e 1 mg/L (respetivamente)

Diluir 0,1 mL de solução intermédia II de HMF e 0,125 mL de solução intermédia III de cafeína para 5 mL com fase móvel.

Solução de branco cromatográfico

Diluir, na proporção 1:1, fase móvel e água ultra-pura.

2.2.2.6. Soluções padrão para a reta matriciada de cafeína

A partir da solução intermédia de cafeína III (exceto o padrão mais baixo, preparado a partir da solução intermédia de cafeína VI) (secção 2.2.2.1), foram preparadas 4 soluções padrão de concentrações compreendidas entre 0,2 mg/L e 4,8 mg/L (Tabela 10). As soluções padrão foram preparadas para um volume final de 5 mL em fase móvel.

Tabela 10: Preparação das soluções de cafeína para a reta matriciada.

Solução intermédia III (mL)	Solução padrão (mg/L)
0	0
0,10	0,20
0,25	1,0
0,90	3,6
1,2	4,8

Estas soluções também foram utilizadas na preparação das amostras para a análise de cafeína por HPLC-MS/MS.

2.2.2.7. Soluções padrão para a reta de calibração *surrogate* (5'-hidroximetil-2'-furaldeído, HMF)

A partir da solução intermédia II de HMF (secção 2.2.2.2) foram preparadas 6 soluções padrão de concentrações compreendidas entre 1 mg/L e 16 mg/L (Tabela 11). As soluções padrão foram preparadas para um volume final de 10 mL em fase móvel.

Tabela 11: Preparação das soluções padrão de HMF para a curva de calibração.

Solução intermédia (mL)	Solução padrão (mg/L)
0,20	1,0
0,80	4,0
1,6	8,0
2,4	12
3,2	16

2.2.2.8. Fase móvel

O eluente foi preparado de acordo com os requisitos da farmacopeia europeia (Ph Eur monograph 0267) (255). Misturar 25 mL de acetonitrilo, 20 mL de tetrahydrofurano e perfazer o volume com uma solução de acetato de sódio a 0,82 g/L. Acertar o pH a 4,5 com ácido acético glacial. Desgaseificar a solução (ultrassons).

2.2.3. Biomarcadores de efeito – análise de AChE, LPO e ETS

2.2.3.1. Acetilcolinesterase (AChE)

Solução tampão Tris-HCl 100 mM, pH = 8,0

Pesar 12,11 g de tris-(hidroximetil)-aminometano, dissolver num pouco de água ultra-pura e diluir para 1000 mL. Acertar o pH para 8,0 com HCl concentrado. Manter a solução refrigerada (4°C) até à sua utilização.

Solução de acetilcolina

Pesar 0,0058 g de acetilcolina e dissolver em 2 mL de água ultra-pura. Solução extemporânea. Durante a sua utilização manter em banho de gelo.

Solução DTNB

Pesar 0,0016 g de ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB) e dissolver em 4 mL de solução de Tris-HCl 100 mM. Solução extemporânea. Durante a sua utilização manter em banho de gelo.

Solução Triton 10%

Diluir 10 µL de Triton X-100 em 10 mL de água ultra-pura. Manter a solução refrigerada (4°C) até à sua utilização.

2.2.3.2. Peroxidação lipídica (LPO)

Solução mãe de Tris 0,2 M

Pesar 24,2 g de Tris-(hidroximetil)-aminometano, dissolver num pouco de água ultra-pura e diluir para 1000 mL. Manter a solução refrigerada (4°C) até à sua utilização.

Solução de ácido clorídrico [0,1N]

Diluir 1,66 mL de HCl a 69% em 150 mL de água Ultra-pura. Perfazer para um volume de 200 mL. Manter sempre a solução na hotte.

Solução Tris-HCl [0,02M]

Diluir 50 mL da solução de ácido clorídrico em 100 mL da solução mãe de Tris. Diluir para 1000 mL com água ultra-pura. Acertar o pH para 8,6 com HCl. Manter a solução refrigerada (4°C) até à sua utilização.

Solução BHT

Pesar 1,102 g de hidroxitolueno butilado e dissolver em 10 mL de acetonitrilo. Manter a solução refrigerada (4°C) até à sua utilização. Solução estável durante 1 mês.

Tampão de homogeneização Tris-NaCl pH 8,6

Pesar 1,4228 g de Tris-(hidroximetil)-aminometano e dissolver em 500 mL de água ultra-pura (com auxílio do agitador magnético). Pesar 8,766 g de NaCl e dissolver na solução preparada (com auxílio do agitador magnético). Diluir para 1000 mL com água ultra-pura. Ajustar o pH para 8,6 com HCl. Manter a solução refrigerada (4°C) até à sua utilização.

Reagente R₁

Pesar 0,107g de N-metil-2-fenilindone e dissolver em 50 mL de acetonitrilo. Solução estável durante uma semana.

Reagente R₁ diluído

Diluir 18 mL de reagente R1 em 6 mL de metanol. Manter a solução refrigerada (4°C) até à sua utilização. Solução estável durante 2 dias.

Reagente R₂

Ácido metanosulfônico puro.

Padrão de malonaldeído bis(dimetil acetal), MDA

- *Solução A* (30 mM) - diluir 1 mL de MDA em 201 mL de Tris- NaCl pH 8,6. Solução estável durante meses.
- *Solução B* (10 mM) - diluir 1 mL da solução A em 2 mL da solução Tris-NaCl pH 8,6. Solução extemporânea.
- *Solução C* (20 µM) - Diluir 20 µL da solução B em 10 mL da solução Tris-NaCl pH 8,6. Solução extemporânea.

2.2.3.3. Sistema de transporte de eletrões (ETS)

Tampão fosfato pH 8,4

Pesar 24 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 46 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Dissolver para 1000 L com água ultra-pura. Acertar o pH com NaOH 6N.

Tampão de homogeneização ETS

Pesar 0,0377 g de MgSO_4 e 1,5 g de polivinilpirrolidona. Dissolver em 181 mL de tampão fosfato pH 8,4 e 2 mL de Triton. Diluir para 1000 mL com água ultra-pura.

Solução substrato

Pesar 0,1206 g de NADH e 0,0208 g de NADPH. Diluir em 18 mL de tampão fosfato pH 8,4 [0,1M] e 0,3 mL de Triton. Diluir para 100 mL com água ultra-pura. Solução estável durante uma semana a -4°C .

Solução de coloração

Pesar 0,1011 g de p-IodoNitroTetrazolium (INT) e diluir para 25 mL com água ultra-pura. Solução estável durante várias semanas a $2-8^\circ\text{C}$.

Solução de paragem

Homogeneizar 15 mL de solução de formalina e 15 mL de H_3PO_4 .

3. Amostras de moluscos bivalves

As amostras de moluscos bivalves foram provenientes da Ria Formosa e da Ria do Alvor, no Algarve. A colheita das amostras foi realizada em 7 pontos diferentes pertencentes à Ria de Alvor, Praia de Faro, Olhão e Tavira na Ria Formosa classificados como Alvor #1, Alvor #2, Praia de Faro, Ramalhete, Ludo, Olhão e Tavira. Os moluscos

bivalves pertencem a seis espécies, nomeadamente, a amêijoia boa (*Ruditapes decussatus*), o berbigão (*Cerastoderma edule*), a lambujinha (*Scrobicularia plana*), o lingueirão (*Solen marginatus*), o mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*) e a ostra (*Crassostrea spp.*). Para melhor compreensão dos resultados, o número de indivíduos por espécie e local serão apresentados no Capítulo VI, Secção 4.1, Tabela 23.

Em paralelo procedeu-se à colheita de 1 L de água do mar de cada um dos sete pontos de amostragem. No local de amostragem, analisaram-se vários parâmetros da qualidade da água, com recurso a sonda multiparamétrica YSI 6820, nomeadamente, temperatura, salinidade (Sal), pH e oxigénio dissolvido (O₂, % saturação).

4. Técnicas

4.1. Validação do método de HPLC-UV

A implementação e validação do método de HPLC-UV para a quantificação da cafeína baseou-se na norma ISO 8466—1 (256). Realizaram-se vários testes para avaliar o intervalo de linearidade, a gama de trabalho, os limiares analíticos e a precisão em condições de repetibilidade.

4.1.1. Condições cromatográficas

As condições cromatográficas aplicadas à análise da cafeína basearam-se nas condições descritas na monografia da cafeína da farmacopeia europeia (255), as quais estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12: Condições cromatográficas para a determinação da cafeína por HPLC-UV.

Fase móvel	ACN: THF: NaCH ₃ COO (pH = 4,5)*
Coluna cromatográfica	C18, 125 mm × 4 mm × 5 µm
Sistema de eluição	Isocrático
Fluxo	1 mL/min
Comprimento de onda (λ)	276 nm
Volume de injeção	50 µL
Tempo de corrida (min)	15
Tempo de retenção (CAF), t_R	8 min
Tempo de retenção (HMF), t_R	2 min

*Ver secção 2.2.2.8

4.1.2. Estudo da linearidade

Para o estudo da linearidade do método de HPLC-UV, foram injetadas 26 soluções padrão com concentrações de cafeína entre 5 µg/L e 60 mg/L (secção 2.2.2.3, Tabela 8). Aos dados obtidos foram aplicados vários testes estatísticos para a avaliação do intervalo linear do método, nomeadamente, a análise de resíduos, o teste de RIKILT e o teste de Mandel ou Fisher/Snedecor.

Os critérios de aceitação internos estabelecidos para a aceitação dos resultados foram:

- Coeficiente de determinação (R^2) $\geq 0,995$
- Coeficiente de variação do método $\leq 5,0\%$
- Valor do teste de análise de resíduos $\pm 15\%$
- Valor do teste das áreas normalizadas $\geq 85\%$ e $\leq 115\%$
- Valor do teste de RIKILT $\pm 10\%$
- Teste de Mandel, $VT < F_{(1, N-3, 95\%)}$

4.1.3. Gama de trabalho

Após definir os intervalos de linearidade, a gama de trabalho foi avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. Analisaram-se 10 réplicas da solução padrão de menor concentração e 10 réplicas da solução padrão de concentração mais alta de cada um dos intervalos de linearidade. A gama de trabalho está bem ajustada se o valor teste (VT) for inferior ou igual ao F tabelado de Fisher/Snedecor para um intervalo de confiança de 99% ($VT \leq F_{(N-1, N-1, 99\%)}$).

4.1.4. Estudo dos limiares analíticos

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados em condições de repetibilidade e com base no desvio padrão residual da reta de calibração, de acordo com as equações 1-4. O requisito interno para aceitação dos resultados foi que o LQ fosse inferior ao primeiro nível de concentração da gama de trabalho.

$$LD = 3 \times DP \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = 10 \times DP \quad \text{Equação 2}$$

em que:

DP desvio padrão associado à leitura de 10 padrões em condições de repetibilidade

$$LD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 3}$$

$$LQ = \frac{S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 4}$$

em que:

$S_{y/x}$ desvio padrão residual da curva de calibração da cafeína

b Declive da curva de calibração da cafeína

4.1.5. Estudo da precisão instrumental

A precisão instrumental foi estudada para as três gamas de trabalho em condições de repetibilidade. Analisaram-se 10 soluções de dois níveis de concentração da cafeína (limite superior e inferior de cada gama de trabalho) durante a mesma série de trabalho.

A precisão intermédia foi apenas estudada na gama de concentração mais baixa (0,5 mg/L a 2,4 mg/L). Ao longo das várias séries de trabalho, as duas soluções padrão controlo de cafeína (0,5 mg/L e 2,4 mg/L) foram analisadas. Calculou-se o erro relativo associado a cada determinação.

4.1.6. Método de pré-tratamento da amostra, QuEChERS

Para a extração, limpeza e concentração da cafeína dos bivalves utilizou-se o método de pré-tratamento QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*). As condições de ensaio foram adotadas do método validado para as amêijoas (143), aplicando-se estudos de efeito de matriz para validar o método para os restantes bivalves. De forma resumida, a técnica é processada em 7 etapas, nomeadamente:

- a) Pesar $1 \pm 0,1$ g de amostra de molusco bivalve;
- b) Adicionar 1 mL de solução intermédia I de HMF a 1000 mg/L (diluída em fase móvel) e 10 mL de acetonitrilo;
- c) Homogeneizar cerca de dois minutos, transferir o sobrenadante para um cartucho para dSPE e homogeneizar novamente (2 minutos);
- d) Centrifugar durante 20 minutos a 5000 rpm;
- e) Transferir o sobrenadante para um cartucho de limpeza, homogeneizar (2 minutos) e centrifugar 20 minutos a 4000 rpm;
- f) Retirar o sobrenadante para um tubo de vidro e levá-lo à secura no turbovap, 50 °C, e pressão 4,5 bar;
- g) Reconstituir em 1 mL de água ultra-pura.

A etapa (b) é uma alteração ao método descrito por Rodrigues *et al.* (143), de forma a corrigir problemas associados aos efeitos de matriz.

A Figura 13 apresenta as várias etapas do método QuEChERS para a análise da cafeína nos moluscos bivalves.

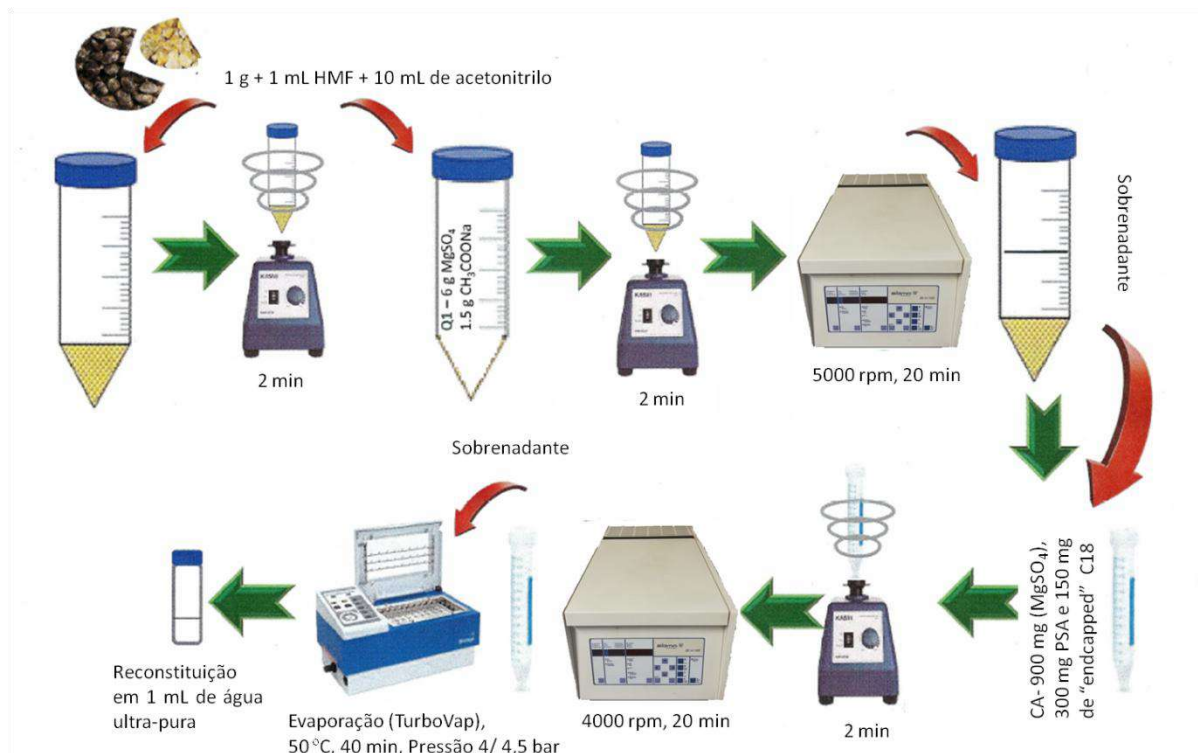


Figura 13: Etapas do método QuEChERS para a análise da cafeína por HPLC-UV.

4.1.7. Efeito de matriz

Para avaliar as interferências da matriz na quantificação da cafeína por HPLC-UV realizaram-se ensaios de recuperação nos moluscos bivalves.

As amostras de moluscos bivalves, antes do pré-tratamento por QuEChERS foram fortificadas com 50 μ L (18 μ g/g) e 100 μ L (36 μ g/g) da solução intermédia I de cafeína a 358 mg/L (secção 2.2.2.1). A fortificação foi efetuada após a homogeneização e pesagem da amostra ((etapa b) da secção 4.1.6.). Mesmo considerando recuperações baixas (10% e 25%), o nível de fortificação permitiria obter um sinal cromatográfico superior ao limite de quantificação do método (1,0 μ g/g).

Paralelamente, também foram analisadas as amostras sem fortificação.

Ambas as amostras (fortificadas e não fortificadas) foram analisadas no HPLC-UV. Foram efetuadas 4 replicados por cada nível de fortificação e cada replicado foi analisado 4 vezes por HPLC-UV.

A percentagem de recuperação (%Rec) foi determinada de acordo com a equação 5:

$$\%Rec = \frac{(C_f - C_a)}{C_{Fort} \times V_{Fort}} \times \frac{V_f}{V_i} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

em que:

C_f	concentração de cafeína na amostra fortificada, lida na reta de calibração, mg/L
C_a	concentração de cafeína na amostra não fortificada, lida na reta de calibração, mg/L
C_{Fort}	concentração de cafeína da solução padrão usada na fortificação, mg/L
V_{Fort}	volume da solução de cafeína usada na fortificação, mL
V_f	volume de extrato final para análise cromatográfica, mL (200 µL)
V_i	volume de extrato inicial para análise cromatográfica, mL (100 µL)

Devido aos baixos valores de recuperação (< 30%), foi necessário adicionar um padrão interno de concentração ou *surrogate* (5'-Hidroximetil-2'-furaldeído, HMF). Deste modo, foi necessário avaliar a recuperação da cafeína com a adição deste *surrogate*.

As análises posteriores para a avaliação da recuperação da cafeína foram realizadas com a fortificação em simultâneo de 50 µL de solução de cafeína a 358 mg/L e 1000 µL de *surrogate* a 1000 mg/L.

4.1.7.1. Curva de calibração do *surrogate* (HMF)

Foram preparadas 6 soluções padrão de concentrações compreendidas entre 1 mg/L e 16 mg/L conforme descrito na 2.2.2.7, Tabela 11.

Os critérios de aceitação internos estabelecidos para a aceitação dos resultados foram:

- Coeficiente de determinação (R^2) $\geq 0,995$
- Coeficiente de variação do método $\leq 5,0\%$

4.1.7.2. Reta matriciada da cafeína

Depois do pré-tratamento das amostras (secção 4.1.6.), diluir o extrato obtido e os padrões preparados anteriormente (secção 2.2.2.6, Tabela 10) numa proporção de 1:1, para um volume total de 200 μ L. Injetar as soluções no HPLC-UV.

4.1.8. Limiares analíticos do método global

Após os estudos de recuperação, foi estimado o limite de quantificação do método global (MQL), QuEChERS-HPLC-UV. A determinação do MQL é calculada de acordo com a equação 6:

$$\text{MQL} = \frac{C_P}{F_C} \times \frac{100}{\text{Rec}} \quad \text{Equação 6}$$

em que:

C_P	concentração da cafeína no padrão de calibração (mg/L), correspondente ao padrão de menor concentração
F_C	fator de concentração
Rec	percentagem de recuperação (%)

4.2. Análise de fármacos nas amostras de águas marinhas

As águas marinhas foram analisadas relativamente a fármacos por extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida associada à espectrometria de massa *tandem* (HPLC-MS/MS) de acordo com o método descrito por Gaffney *et. al* (224). A preparação da amostra por SPE foi realizada na Faculdade de Farmácia da Universidade (FFUL), Laboratório de Bromatologia e Qualidade da Água, mas a análise cromatográfica foi realizada no Laboratório de Química Orgânica da Empresa Portuguesa das Águas Livres

(EPAL). No entanto, todas as retas matriciadas foram preparadas na FFUL, assim como o tratamento dos resultados cromatográficos.

As amostras de águas marinhas foram recolhidas em frascos de vidro âmbar de 2000 mL e armazenadas a 5 ± 3 °C. As amostras foram extraídas no prazo de 2 dias após a amostragem. Os extratos metanólicos das amostras foram analisados por HPLC-MS/MS no prazo de 30 dias após a extração.

A toma de amostra para a extração em fase sólida é de 500 mL. Cada amostra de água marinha foi analisada quatro vezes, na totalidade (500 mL) e em mais três diluições: 50 mL/500 mL, 25 mL/500 mL e 10 mL/500 mL.

As condições estabelecidas para análise das águas em SPE estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13: Condições de SPE e de secagem no Turbovap.

Volume de metanol para condicionamento do cartucho	5 mL
Volume de amostra (água ultra-pura)	500 mL
Fluxo de passagem da amostra	20 mL/min
Volume de lavagem (água ultra-pura)	5 mL
Volume de eluição (metanol)	8 mL
Gás de secagem do cartucho	Azoto
Tempo de secagem do cartucho	15 min
Condições no Turbovap	
Gás	Árgon
Pressão	5 psi
Temperatura	35 °C

Para 6 *vials* de 1 mL adicionar 100 µL de extrato e 100 µL de cada uma das soluções padrão de fármacos. A Tabela 14 apresenta os limiares analíticos dos fármacos analisados. Os compostos estão organizados pelos respetivos tempos de retenção.

Tabela 14: Limiares analíticos e as gamas de trabalho dos fármacos em águas marinhas analisados por SPE-HPLC-MS/MS (método interno).

Composto	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
Atenolol	4,2	14,0
Paracetamol	3,6	12,0
Sulfadiazina	5,3	18,0
Sulfapiridina	9,5	32,0
Cafeína	7,2	24,0
Sulfametoxazol	3,5	12,0
Metoprolol	6,0	20,0
Propanolol	4,3	14,0
Cortisona	7,1	24,0
Carbamazepina	2,0	6,50
Ácido Clofíbrico	34	112
Naproxeno	4,1	14,0
Gestodeno	4,0	14,0
Testosterona	1,4	4,60
Bezafibrato	3,5	12,0
Ibuprofeno	7,6	25,0
Diclofenac	4,2	14,0
Estriol	48	162
Estrona	49	164
β - estradiol	45	149
17- α -etinilestradiol	53	177
Dietilestilbestrol	28	94,0
Eritomicina	16	54,0
Fluoxetina	8,2	27,0

MDL- Limite de detecção do método; MQL- Limite de quantificação do método.

4.3. Caracterização morfométrica

A massa total (g), a massa da casca (g) e a massa edível (g) foi determinada em todos os moluscos bivalves (n=357). Paralelamente foram determinadas as dimensões dos vários moluscos bivalves, comprimento (mm), largura (mm) e espessura (mm). As dimensões foram determinadas com auxílio de uma craveira, tal como ilustrado na Figura 14 para a amêijoia boa (*Ruditapes decussatus*) e para a ostra (*Crassostrea spp.*).

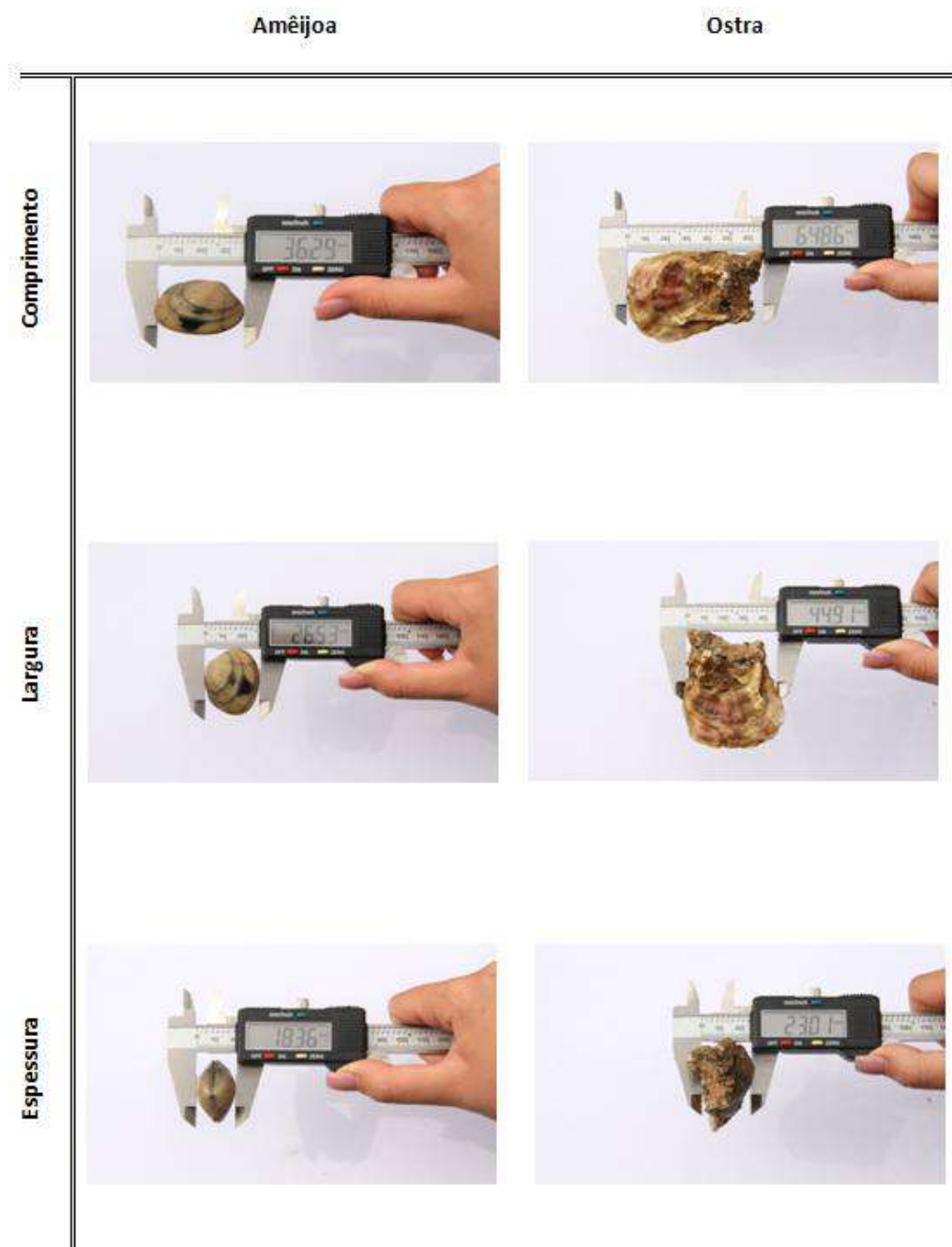


Figura 14: Determinação do comprimento, largura e espessura da amêijoia boa (*Ruditapes decussatus*) e a ostra (*Crassostrea spp.*).

O índice de condição (IC) de cada indivíduo é calculado através da razão entre a massa edível e a massa total (equação 7) e é expresso em percentagem (%).

$$IC (\%) = \frac{m_{edível}}{m_{total}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

em que:

$m_{edível}$ massa edível da amostra, g

m_{total} massa total da amostra (concha e parte edível), g

4.4. Caracterização nutricional

Para a caracterização nutricional dos moluscos bivalves foram determinados vários parâmetros, nomeadamente, matéria gorda total, proteínas, cinza, teor de humidade e hidratos de carbono.

O teor de matéria gorda total das amostras foi determinado pelo método gravimétrico após extração por Soxhlet, utilizando como solvente n-hexano, de acordo com os requisitos da AOAC método 960.39 (254). Os resultados são expressos em g/100 g de molusco bivalve, de acordo com a equação 8.

Todas as determinações dos parâmetros nutricionais são expressas por 100 g de produto fresco.

$$\text{Materia gorda (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

em que:

m_2 massa do balão com a amostra após secagem, g

m_1 massa do balão (tara), g

m massa da amostra, g

A cinza das amostras foi determinada pelo método gravimétrico a 550 °C, de acordo com a norma NP 2032:1988 (257). Os resultados são expressos em g/100 g de molusco bivalve, de acordo com a equação 9.

$$\text{Cinza (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

em que:

m_1	massa do cadinho (tara), g
m_2	massa do cadinho com a amostra após calcinação, g
m	massa da amostra, g

O teor de proteína bruta das amostras foi determinado pelo método macro Kjeldahl, oxidação em meio ácido com catalisador de cobre (380 °C) seguido de uma volumetria ácido-base, utilizando como titulante o ácido sulfúrico N/10, de acordo com os requisitos da AOAC, método 928.08 (254). Os resultados são expressos em g/100 g de molusco bivalve, de acordo com a equação 10.

$$\text{Proteína (\%)} = \left(\frac{(A-B) \times 0,14}{m} \right) \times 6,25 \quad \text{Equação 10}$$

em que:

A	volume de titulante (H ₂ SO ₄ N/10) utilizado na titulação da amostra, mL
B	volume de titulante utilizado na titulação do branco, mL
m	massa da amostra, g
0,14	massa equivalente de nitrogénio na amostra, g
6,25	fator Kjeldahl ou fator Jones aplicável ao pescado (142)

O teor de humidade das amostras foi determinado pelo método gravimétrico a 105 °C, de acordo com a norma NP 2282: 1991 (258). Os resultados são expressos em g/100 g de molusco bivalve, de acordo com a equação 11.

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

em que:

m_1	massa da cápsula, areia e vareta (tara), g
m_2	massa da cápsula, areia, vareta e amostra, g
m_3	massa da cápsula com areia, vareta e a amostra seca, g

Os hidratos de carbono foram determinados por cálculo, subtraindo ao valor da matéria seca, o valor da matéria gorda, das proteínas e da cinza, de acordo com a equação 12 (259):

$$\text{Hidratos de carbono (\%)} = 100 - (A + B + C + D) \quad \text{Equação 12}$$

em que:

A	matéria gorda total, g/100 g de molusco bivalve
B	proteína, g/100 g de molusco bivalve
C	cinza, g/100 g de molusco bivalve
D	teor de água da amostra, g/100 g molusco bivalve

4.4.1. Controlo de qualidade interno

A precisão dos resultados dos vários parâmetros nutricionais foi avaliada em termos de análise de duplicados, segundo a equação 13:

$$DD (\%) = \frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

em que:

DD	diferença de duplicados em valor percentual, %
X_1	concentração da primeira réplica da amostra ou da solução controlo, mg/L
X_2	concentração da segunda réplica da amostra ou da solução controlo, mg/L
\bar{X}	concentração média da primeira e segunda réplica da amostra ou da solução controlo, mg/L

Na determinação da proteína pelo método Kjeldahl também foi determinada a recuperação (Rec, %), recorrendo a um padrão de fenilalanina.

4.5. Quantificação da cafeína

Concluído o pré-tratamento das amostras dos moluscos bivalves por QuEChERS (secção 4.1.6.), obtém-se um extrato que é diluído na proporção 1:1 em fase móvel.

Deste modo, e para preparar a reta matriciada, diluir 100 µL de extrato com 100 µL de cada uma das soluções padrão de calibração. Para o branco, diluir 100 µL de extrato com 100 µL de fase móvel.

Após a diluição, inicia-se a leitura das amostras no HPLC-UV, de acordo com as condições descritas na Tabela 12 (secção 4.1.1.).

A concentração de cafeína nas amostras é calculada através da equação 14:

$$\text{CAF, mg/g} = \frac{A \times V_f \times V_e}{V_i \times m} \quad \text{Equação 14}$$

em que:

A	concentração da cafeína na amostra (mg/L), lida na curva de calibração
V _f	volume de extrato final para análise cromatográfica, mL (200 µL)
V _i	volume de extrato inicial para análise cromatográfica, mL (100 µL)
V _e	volume de extrato após concentração no Turbovap, mL (1 mL)
m	massa de molusco bivalve utilizada no ensaio, g

Se a análise de cafeína for analisada diretamente no extrato de acetonitrilo após evaporação no Turbovap, a concentração em cafeína é determinada através da equação 15:

$$\text{CAF, mg/g} = \frac{A}{m} \quad \text{Equação 15}$$

em que:

A	concentração da cafeína na amostra (mg/L), lida na curva de calibração
m	massa de molusco bivalve usada no ensaio, g

Calcular a quantidade de cafeína da amostra na curva de calibração (A), a partir do fator de resposta (FR), através da equação 16:

$$\text{mg/L CAF (A)} = \frac{A_{c-a} \times C_s}{\text{FR} \times A_{s-a}} \quad \text{Equação 16}$$

em que:

A_{c-a}	área do pico cromatográfico da cafeína na amostra
A_{s-a}	área do pico cromatográfico do <i>surrogate</i> na amostra
C_s	concentração do <i>surrogate</i> adicionado à amostra, mg/L
FR	fator de resposta

onde:

$$\text{FR} = \frac{A_{c-p} \times C_{s-p}}{C_{c-p} \times A_{s-p}} \quad \text{Equação 17}$$

em que:

A_{c-p}	área da cafeína no padrão de calibração
A_{s-p}	área do <i>surrogate</i> no padrão de calibração
C_{c-p}	concentração da cafeína no padrão de calibração, mg/L,
C_{s-p}	concentração do <i>surrogate</i> no padrão de calibração, mg/L

4.5.1. Controlo de qualidade interno

Diariamente (em cada série de trabalho) analisar 2 soluções de padrão controlo cromatográfico, 2,4 mg/L de cafeína e 0,5 mg/L de cafeína com 1 mg/L de HMF (secção 2.2.2.5.) para avaliar a veracidade do método. Analisar um branco cromatográfico e efetuar um ensaio duplicado (precisão do método).

A veracidade do método é avaliada através da determinação do erro relativo, segundo a equação 18:

$$\text{Erro (\%)} = \frac{C_{\text{Exp}} - C_{\text{Teor}}}{C_{\text{Teor}}} \times 100 \quad \text{Equação 18}$$

em que:

C_{Exp}	concentração experimental obtida na análise da solução controle, mg/L
C_{Teor}	concentração teórica ou de referência da solução controle, mg/L

4.6. Biomarcadores de efeito

Analisaram-se 2 a 5 indivíduos de cada espécie de moluscos bivalves e foram efetuadas no mínimo 2 réplicas de cada parâmetro, por indivíduo.

4.6.1. Acetilcolinesterase (AChE)

O método utilizado para a determinação da atividade da acetilcolinesterase foi adotado do descrito por Ellman *et al.* (1961) (260). Foram adotadas ligeiras alterações para a determinação deste biomarcador nos moluscos bivalves tais como um prévio processamento das amostras, alterações na concentração da solução de acetilcolina e preparação da solução DTNB e os volumes das várias soluções colocadas na célula, para posterior leitura no espectrofotômetro, também foram ajustados. A equação para o cálculo da AChE sofreu assim ajustes em função dessas alterações de volumes das soluções.

Este método está dividido em três etapas: i) processamento das amostras; ii) determinação da atividade da AChE; iii) determinação da proteína pelo método Bradford.

i) Triturar e homogeneizar um indivíduo. Calcular a tara de um tubo Falcon de 50 mL, colocar o homogeneizado e voltar a pesar. Calcular a massa do indivíduo (m). Adicionar a solução Tris-HCl (100 mM) numa proporção de 1:5 (g tecido: mL de solução). Adicionar 10 μ L da solução Triton 10% por cada mL da solução Tris-HCl (100 mM) adicionada anteriormente. A adição dos reagentes deve ser efetuada em banho de gelo. Homogeneizar no homogeneizador ultra-turrax, cerca de dois minutos. Centrifugar o homogenato a 10000 rpm, a 4 °C durante 30 minutos. Por ultimo, transferir o sobrenadante para outro tubo Falcon de 25 mL.

ii) No espectrofotômetro de duplo feixe, inserir duas células de vidro (0,5 cm) com solução de Tris-HCl pH 8,0 e ler a absorvência a 595 nm. Aceitar a limpeza das células de leitura, desde que o valor de absorvência seja inferior a 0,005 (zero do equipamento).

Num tubo de vidro, adicionar 1,6 mL de Tris-HCl pH 8,0 (à temperatura ambiente) e 200 µL de DTNB (gelado). Deixar a mistura estabilizar por 3 minutos. Colocar a mistura na célula e, no momento da leitura, adicionar 200 µL da solução de acetilcolina. Ler o incremento da absorvência durante 1 minuto utilizando como solução de referência o Tris-HCl pH 8,0. Repetir o ensaio 3 vezes. Utilizar este valor como o valor de branco do ensaio.

No caso das amostras, adicionar num tubo de ensaio de vidro 1,5 mL de Tris-HCl pH 8,0 (à temperatura ambiente), 200 µL de DTNB (gelado) e 100 µL de amostra. Deixar a mistura estabilizar por 3 minutos. Colocar a mistura na célula e, no momento da leitura, adicionar 200 µL da solução de acetilcolina. Ler o incremento da absorvência durante 1 minuto utilizando como solução de referência o Tris-HCl pH 8,0. Determinar a absorvência utilizando como solução de referência o Tris-HCl pH 8,0. Repetir o ensaio 2 vezes.

iii) No espectrofotômetro, inserir duas células de vidro (1 cm) com 3 mL de Reagente de Bradford (Coomassie), 60 µL de Tris-HCl 100 mM e ler a absorvência a 595 nm. Aceitar a limpeza das células de leitura, desde que o valor de absorvência seja inferior a 0,005 (zero do equipamento).

Em tubos de vidro, adicionar 3mL de Reagente de Bradford (Coomassie) e 60 µL de amostra. Homogeneizar no *vortex*. Deixar estabilizar por 10 minutos. Efetuar duas réplicas por amostra. Ler a absorvência a 595nm. Se for necessário diluir a amostra, preparar 150 µL de amostra para 300 µL de água desmineralizada.

A concentração em acetilcolinesterase é determinada segundo a seguinte equação (equação 19):

$$AChE \left(\frac{nmol}{min} mg \text{ prot} \right) = \frac{\Delta A}{\epsilon} \times \frac{V_C}{V_S} \times \frac{10^3}{[P]} \times 10^6 \quad \text{Equação 19}$$

em que:

ΔA	diferença entre as absorvências iniciais e finais, min^{-1}
ϵ	coeficiente de extinção molar, $1.36 \times 10^4 \text{ mL/nmol}$
V_C	volume da célula, mL
V_S	volume de amostra, μL
$[P]$	concentração de proteínas totais, mg/mL

4.6.2. Peroxidação lipídica (LPO)

Para a quantificação da peroxidação lipídica nas amostras, utilizou-se um método desenvolvido por Erdelmeier *et al.* (1998) com ligeiras modificações (261). Estas consistiram na adição de um processamento das amostras e na toma de análise, enquanto as condições espectrofotométricas permaneceram inalteradas.

Semelhante ao anterior biomarcador, este procedimento também está dividido em três etapas: i) processamento das amostras; ii) reta de calibração; iii) determinação do grau de peroxidação lipídica nas amostras.

i) Triturar e homogeneizar um indivíduo. Calcular a tara de um tubo Falcon de 50 mL, colocar o homogeneizado e voltar a pesar. Calcular a massa do indivíduo (m). Adicionar a solução Tris-HCl (0,02 mM) numa proporção de 1:3 (g tecido: mL de solução). Adicionar 10 μL da solução BHT por cada mL da solução Tris-HCl (0,02 mM) adicionada anteriormente. A adição dos reagentes deve ser efetuada em banho de gelo. Homogeneizar no homogeneizador ultra-turrax, cerca de dois minutos. Centrifugar o homogenato a 10 000 rpm, a 4 °C durante 30 minutos. Por último, transferir o sobrenadante para outro tubo Falcon de 25 mL.

ii) Traçar a reta de calibração absorvência *versus* concentração de MDA (μM).

Preparar 8 soluções padrão de MDA (malonaldeído bis(dimetil acetal)) por diluição da solução mãe com solução Tris-NaCl, de acordo com a Tabela 15.

Tabela 15: Preparação dos padrões para a curva de calibração, absorvência *versus* concentração de MDA (μM).

Volume Sol. C (μL)	Volume Sol. Tris-NaCl (μL)	Concentração (μM)
0	2000	0
50	1950	0,5
125	1875	1,25
250	1750	2,5
500	1500	5
1000	1000	10
1500	500	15
2000	0	20

- Efetuar 3 réplicas por padrão.
- Para cada *ependorf*, adicionar 300 μL de cada solução padrão de MDA.
- Adicionar 975 μL de reagente R_1 diluído e agitar no *vortex*.
- Na *hotte*, adicionar 225 μL de reagente R_2 e agitar no *vortex*.
- Incubar a 45 °C durante 1 hora.
- Ler cada um dos padrões a 586 nm utilizando a solução de Tris-NaCl pH 8,6 como branco.
- **iii)** Repetir a técnica descrita para a curva de calibração, substituindo o padrão por 300 μL de amostra.
- Após incubação, centrifugar as amostras durante 1 minuto ou até formação de *pellet*.
- Ler o sobrenadante a 586 nm utilizando a solução de Tris-NaCl pH 8,6 como branco.
- Efetuar o ensaio em duplicado.

A peroxidação lipídica é determinada segundo a equação 20:

$$\text{MDA (nmol MDA/g protein)} = \frac{\frac{\text{Abs}-a}{b} \times V_T}{ww \times [P]} \times 10^3 \quad \text{Equação 20}$$

em que:

Abs absorvência da amostra, nm

a e b declive e ordenada na origem da curva de calibração ($y = bx + a$)

V_T volume da solução de Tris-HCl, homogeneização da amostra, mL

ww	peso da amostra fresca, g
[P]	concentração de proteínas, mg/g

4.6.3. Sistema de transporte de eletrões (ETS)

O método utilizado para a determinação da atividade da ETS foi descrito por Simčič e Brancelj (2004) (252).

- Homogeneizar cada amostra em 4 mL de tampão de homogeneização ETS gelado, durante 2 minutos a 2000 rpm.
- Levar ao ultrassons durante 20 segundos a 40 W.
- Centrifugar o homogenato durante 4 minutos, 4 °C e 10 000 rpm.
- Se necessário ajustar a proporção de tampão/amostra, para amostras de maior massa, 2 mL de tampão: 1 g amostra.
- Após o processamento dos tecidos, adicionar num tubo de vidro, 0,5 mL de sobrenadante, 1,5 mL de solução substrato e 0,5 mL de solução de coloração.
- O branco é obtido através do mesmo processo, substituindo o sobrenadante pelo tampão de homogeneização.
- Homogeneizar as soluções e incubar durante 40 minutos a 20 °C.
- Adicionar 0,5 mL de solução de paragem da reação e homogeneizar.
- Ler a absorvência a 490 nm utilizando como referência o branco.
- Realizar três réplicas por amostra.
- Se for necessário diluir o extrato, adicionar 0,5 mL de extrato a 4,5 mL de tampão após o processamento dos tecidos.

A atividade da ETS é determinada segundo a seguinte equação (equação 21):

$$\text{ETS (nmol O}_2\text{/min g ww)} = \frac{\text{Abs} \times V_H \times \frac{1}{t} \times V_A}{V_{\text{inc}} \times \text{ww} \times 31.8} \times 10^3 \quad \text{Equação 21}$$

em que:

Abs	absorvência da amostra
V _H	volume de tampão de homogeneização utilizado, mL
t	tempo de incubação, min
V _A	volume da alíquota da amostra, mL

V_{inc}	volume da mistura reacional, mL
ww	massa da amostra fresca, g

4.7. Análise estatística

Todos os resultados são apresentados pela média \pm desvio padrão do número de ensaios realizados (n). Alguns resultados não têm replicados (amostras unitárias).

A análise global dos resultados da caracterização morfométrica, nutricional e de biomarcadores de efeito foi realizada através da análise de variância (ANOVA, *Analysis of variance*) com um factor de significância de 5% ($\alpha=0,05$) (*Windows Office 365, Excel*).

A análise em conjunto dos resultados dos vários parâmetros foi realizada através da análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*).

O PCA foi utilizado para discriminar os principais fatores responsáveis pela variância dos dados morfométricos, nutricionais e de biomarcadores de efeito através do software STATISTICA. Procedeu-se a uma análise multivariada, conjugando os dados morfométricos, com os parâmetros nutricionais e ambientais (variáveis complementares), o contaminante/biomarcador de exposição (cafeína) e os biomarcadores de efeito somente para as espécies que tinham o conjunto de todas as variáveis completas. Esta análise serve para discriminar os fatores que explicam as principais variâncias responsáveis pela variação dos biomarcadores e fatores ambientais.

Capítulo VI- Resultados e discussão

1. Validação do método HPLC-UV

Para analisar a cafeína nas amostras de bivalves é necessário o desenvolvimento e validação de um método que permita, com precisão e exatidão, identificar e quantificar o composto nas amostras em concentrações vestigiais ($< \mu\text{g}$ xenóbiotico/g amostra).

A implementação, em rotina, de um método analítico requer a validação do método de quantificação (instrumental) e do método de preparação das amostras.

1.1. Intervalo linearidade e gama de trabalho

Para a aceitação de um método analítico como validado, este é submetido a vários ensaios prévios e tratamento estatístico dos resultados, os quais devem obedecer a determinados requisitos, os quais são apresentados na secção 4.1.2. do Capítulo V.

Após injetar as 26 soluções padrão de cafeína para o estudo de linearidade, no intervalo de concentrações entre 5 $\mu\text{g/L}$ e 60 mg/L , observou-se que esta gama de intervalo não obedecia a vários requisitos, nomeadamente, o coeficiente de determinação ($R^2 \leq 0,99$) e o coeficiente de determinação do método ($> 5\%$).

A Figura 15 apresenta a curva de calibração da cafeína por HPLC-UV no intervalo de concentrações 5 $\mu\text{g/L}$ e 60 mg/L , na qual é visível três potenciais intervalos de linearidade que correspondem a concentrações de cafeína baixas (até 2,5 mg/L), intermédias (2,5 mg/L e 20 mg/L) e altas (25 mg/L e 60 mg/L). Posteriormente, a gama total foi dividida em três intervalos de concentração (gama baixa, gama intermédia e gama alta), aos quais foram aplicados novamente os vários testes estatísticos.

A gama baixa (GB) abrange concentrações entre os 0,5 mg/L e os 2,4 mg/L . A gama intermédia (GIm) compreende concentrações entre os 4 mg/L e os 20 mg/L . A gama alta (GA) engloba as concentrações entre os 23 mg/L e 60 mg/L .

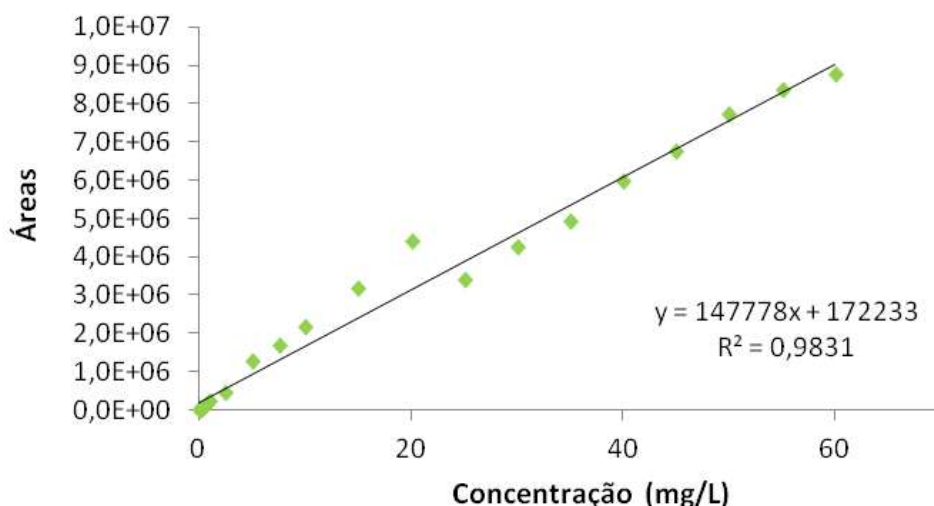
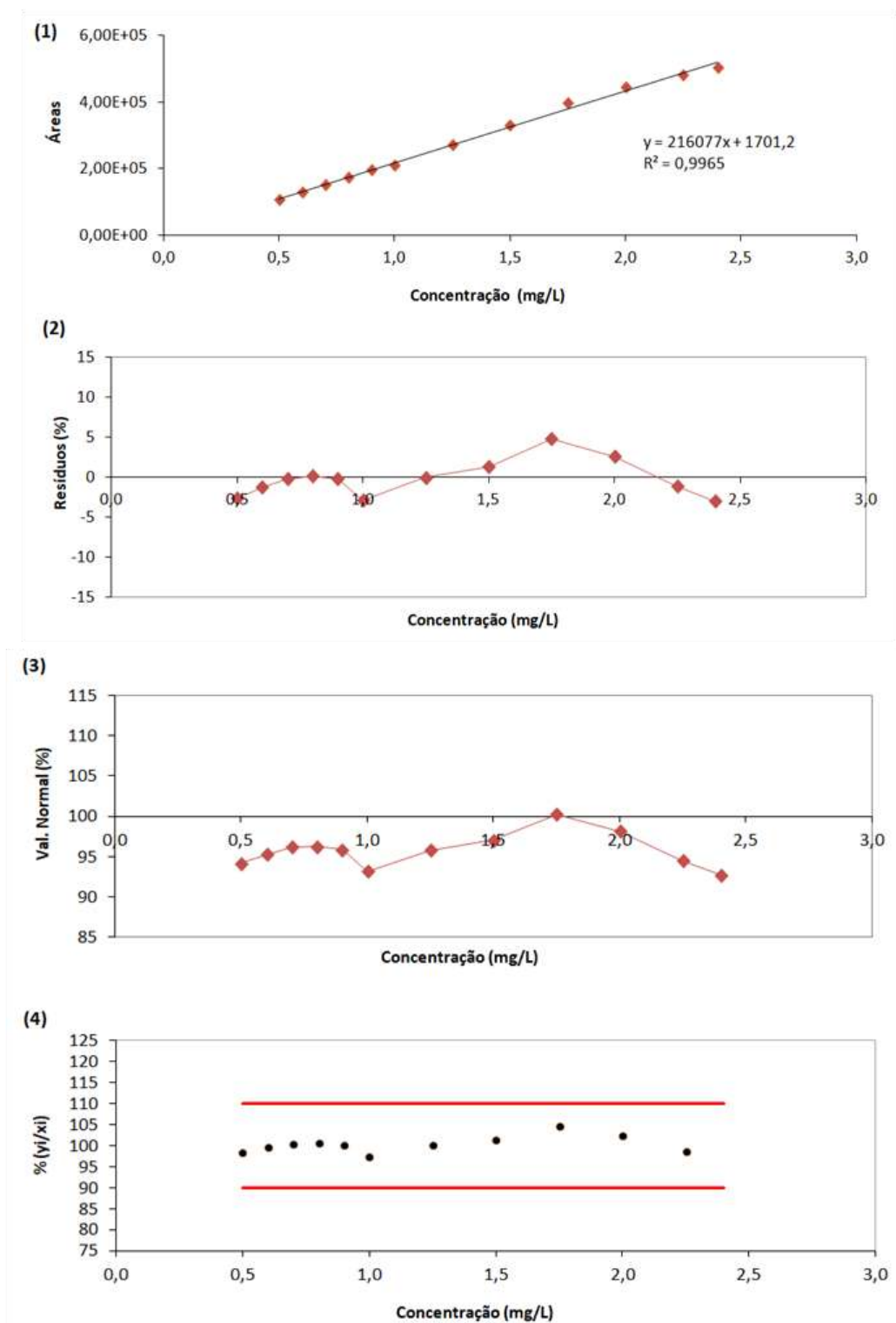


Figura 15: Reta de calibração da cafeína por HPLC-UV no intervalo de concentrações entre os 5 µg/L e os 60 mg/L, CVm = 17,3%.

Na gama baixa foram desprezadas as concentrações inferiores a 0,5 mg/L porque não havia uma boa correlação entre a concentração e o sinal instrumental. Devido à grande amplitude de concentrações em estudo, as áreas obtidas também diferiam em mais de duas ordens de grandeza. Consequentemente, o intervalo de concentrações 5 µg/L e 2,4 mg/L não cumpria os requisitos de aceitação dos testes aplicados, nomeadamente, valores normalizados, análise de resíduos, teste de RIKILT e teste de Mandel.

Mesmo eliminando as concentrações respeitantes à gama baixa, o intervalo de concentrações correspondente à gama intermédia e alta em conjunto (4 mg/L - 60 mg/L) também não apresentam um único intervalo de linearidade.

A título de exemplo, a Figura 16, apresenta os resultados obtidos nos testes estatísticos da gama baixa. Os mesmos testes foram aplicados às restantes gamas de concentrações, para os quais, cumpriram todos os critérios de aceitação.



(5)

Teste de Mandel

Função Linear

 $VT < F_{(1, N-3, 95\%)}$

Distribuição Fisher/Snedecor

Figura 16: Intervalo de linearidade da gama baixa (GB) de concentrações da cafeína por HPLC-UV: (1) método dos mínimos quadrados, (2) análise de resíduos, (3) teste das áreas normalizadas, (4) teste de RIKILT e (5) teste de Mandel.

Na Tabela 16 estão sumarizados os resultados obtidos nos testes estatísticos para os quatro intervalos de concentração estudados.

Tabela 16: Estudo do intervalo linear e gama de trabalho da cafeína por HPLC-UV ($Y = aX + b$).

Parâmetro	Intervalo de concentração			
	GT	GB	Glm	GA
N	26	12	9	13
Concentração (mg/L)	0,005 - 60	0,5 - 2,4	4,0 - 20	23 - 60
R^2	0,9831	0,9965	0,9955	0,9977
a	172233,4	1701,2	-87791,6	-418580
b	147777,9	216077	166299	166105
CV_m , % ($\leq 5\%$)	17,32	3,17	3,28	1,43
Análise de Resíduos ($\leq 15\%$)	[-99; 42]	[-3; 5]	[-5; 7]	[-3; 2]
Áreas Normalizadas ($\leq 15\%$)	[57; 134]	[93; 100]	[97; 107]	[99; 106]
Teste RIKILT ($\leq 10\%$)	[68; 158]	[97; 104]	[96; 106]	[97; 104]
Teste de Mandel	$1,34 \times 10^3 > 3,84$	$-8,65 < 4,60$	$3,05 < 5,99$	$3,13 < 4,96$
$VT \leq F_{(1, N-3, 95\%)}$				
Homogeneidade de variâncias	---	$1,89 < 5,91$	$4,73 < 5,35$	$1,12 < 5,35$
$VT \leq F_{(N-1; N-1; 99\%)}$				

GT - Gama Total; GB - Gama Baixa; Glm - Gama intermédia; GA - Gama Alta; n - número de pontos da reta; R^2 - coeficiente de determinação; a - ordenada na origem; b - declive; CV_m - coeficiente de variação do método; F - valor tabelado de Fisher/Snedecor; VT - valor teste

Após o cumprimento dos requisitos de linearidade nos três intervalos de concentração e face aos valores obtidos no teste de homogeneidade de variâncias, conclui-se que havia três gamas de trabalho para a análise da cafeína por HPLC-UV, ou seja, três gamas de concentração bem ajustadas.

Num estudo relativo à análise de fármacos em águas residuais na estação de tratamento de águas residuais de Beirolos (Lisboa), conduzido por Gaffney *et al.* (2017), foram registadas concentrações máximas de cafeína de 2,9 $\mu\text{g/L}$ nos efluentes (165). Em amostras de amêijoas da espécie *Ruditapes decussatus* de viveiristas da mesma região deste estudo (Ria Formosa), registaram-se valores de cafeína entre 0,54 ng/g e 12 ng/g (2016) e 0,91 ng/g e 6,4 ng/g (2017) (143). Consequentemente, são expectáveis valores de cafeína baixos nas amostras de moluscos bivalves em estudo. Deste modo, selecionou-se a gama baixa para a quantificação de cafeína nos moluscos bivalves e nas águas marinhas.

1.2. Estudo dos limiares analíticos

Estabelecidas as gamas de trabalho para a análise de cafeína por HPLC-UV, foram calculados o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) em condições de repetibilidade e com base no desvio padrão residual da reta de calibração. A Tabela 17 apresenta os limiares analíticos determinados para as várias gamas de concentração.

Tabela 17: Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do método HPLC-UV para a análise da cafeína por HPLC-UV. Limites determinados com base na reta de calibração linear e em ensaios de repetibilidade.

	Gama de trabalho (mg/L)	Reta de calibração		Repetibilidade	
		LD (mg/L)	LQ (mg/L)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
GB	0,5 – 2,4	0,13	0,41	0,05	0,16
GIm	4,0 - 20	1,2	3,9	0,46	1,5
GA	23 - 60	1,8	6,0	1,9	6,2

O limite de quantificação calculado por ambos os métodos, obedece ao requisito de ser inferior ou igual ao primeiro padrão da gama de trabalho.

Na Tabela 17 verifica-se que o LD e LQ calculados através dos ensaios de repetibilidade são inferiores aos calculados com base no desvio padrão residual da reta de calibração da GB e GIM. Na gama alta (GA) os valores calculados através da reta de calibração demonstram ser inferiores aos obtidos através de ensaios de repetibilidade.

Os valores obtidos para o limite de quantificação são valores teóricos porque nas análises de rotina, o LQ é representado pelo padrão de concentração mais baixo da reta de calibração e todos os valores inferiores a essa concentração são reportados como “< LQ”. Deste modo, o limite de quantificação para as várias gamas é de 0,5 mg/L, 4,0 mg/L e 23 mg/L para as gamas baixa, intermédia e alta, respetivamente. Para uma toma de amostra de 1 g, os limites de quantificação reportados em massa de cafeína (μg) por massa de amostra (g) correspondem a 1,0 $\mu\text{g/g}$, 8,0 $\mu\text{g/g}$ e 46 $\mu\text{g/g}$ de cafeína (equações 14 e 15).

1.3. Estudo da precisão instrumental

A precisão instrumental foi avaliada em condições de repetibilidade para as concentrações equivalentes ao limite inferior e superior de cada uma das três gamas de concentrações (GB, GIm, GA). Os resultados estão apresentados na Tabela 18.

Conclui-se que o método de HPLC-UV para a análise da cafeína exibe uma boa repetibilidade nas gamas de concentrações estudadas, apresentando desvios padrão relativos (DPR) inferiores a 5%.

Tabela 18: Estudo da precisão instrumental em condições de repetibilidade (n=10).

	Concentração inferior		Concentração superior	
	Conc. (mg/L)	DPR (%)	Conc. (mg/L)	DPR (%)
GB	0,5	4,7	2,4	2,6
GIm	4	3,7	20	1,8
GA	23	2,8	60	3,8

Para a gama baixa de trabalho (0,5 mg/L – 2,4 mg/L) também foram realizados estudos de precisão intermédia ao longo de 9 séries de trabalho. O valor médio de concentração para o padrão controlo de 0,50 mg/L foi de 0,48 mg/L, apresentando um desvio padrão relativo de 5,6%. Para o padrão de concentração superior (2,4 mg/L), o valor médio de concentração obtido foi de 2,3 mg/L, com um desvio padrão relativo de 2,7%.

1.4. Estudo da veracidade instrumental

A veracidade instrumental foi avaliada em condições de precisão intermédia para a concentração inferior e superior da gama baixa do intervalo linear da cafeína por HPLC-UV.

O erro relativo médio para o padrão controlo de cafeína a 0,50 mg/L foi de 6,1% com variações entre -1,5% e 10% (n=9). O erro relativo médio para o padrão controlo de

cafeína a 2,4 mg/L foi de 4,1% com variações entre 1,7% e 6,7% (n=9). Face aos resultados podemos concluir que o método cromatográfico apresenta uma boa veracidade.

1.5. Efeito de matriz

Para avaliar os efeitos de matriz e devido à escassez de amostra de algumas espécies de moluscos bivalves, os estudos de recuperação foram apenas realizados com amostras de amêijoas da espécie *Ruditapes decussatus*.

Para a fortificação das amostras com 50 µL e 100 µL da solução de fortificação a 358 mg/L de cafeína, as recuperações foram de 24% e 29%, com desvios-padrão relativos de 3,5% e 6,0%, respetivamente. O ensaio foi realizado em quadruplicado.

Devido aos baixos valores de recuperação da cafeína nos moluscos bivalves obtidos pela análise de QuEChERS-HPLC-UV e para contornar os efeitos de matriz, avaliou-se como alternativa ao método de quantificação pelo padrão externo, o método da adição de padrão (reta matriciada) ou o recurso à utilização de um padrão interno de concentração ou *surrogate*.

1.5.1. Método de adição de padrão (reta matriciada)

A Tabela 19 apresenta os resultados do estudo da linearidade da análise de cafeína por HPLC-UV com reta matriciada.

A reta matriciada é linear no intervalo de concentrações estudado (0,5 mg/L a 2,4 mg/L), o qual é igual ao intervalo de concentrações da gama baixa pelo método do padrão externo.

A Figura 17 apresenta a correlação entre ambos os métodos para os cinco níveis de concentração do intervalo linear (0,5 mg/L; 0,7 mg/L; 1,0 mg/L; 1,8 mg/L e 2,4 mg/L).

Além de haver uma boa correlação, as áreas são da mesma ordem de grandeza, o qual é indicativo que a curva de calibração não é afetada pelo efeito de matriz.

Deste modo, recorreu-se ao método do padrão interno de concentração ou *surrogate*, isto é, recorrendo à determinação do fator de resposta com auxílio de um padrão independente.

Tabela 19: Estudo do intervalo linear da cafeína por HPLC-UV ($Y = aX + b$).

Parâmetro	GB
N	5
Concentração (mg/L)	0,5 – 2,4
R^2	0,9998
a	401,384
b	123849,6
CV_m , % ($\leq 5\%$)	1,97
Análise de Resíduos ($\leq 15\%$)	[-6,0 ; 11,0]
Teste RIKILT ($\leq 10\%$)	[93; 98]
Teste de Mandel	0,77 < 18,51
$VT \leq F_{(1, N-3, 95\%)}$	

GB - Gama Baixa; N - número de pontos da reta;
 R^2 - coeficiente de determinação; a - ordenada na origem;
 b - declive; CV_m - coeficiente de variação do método;
 F - valor tabelado de Fisher/Snedecor; VT - valor teste.

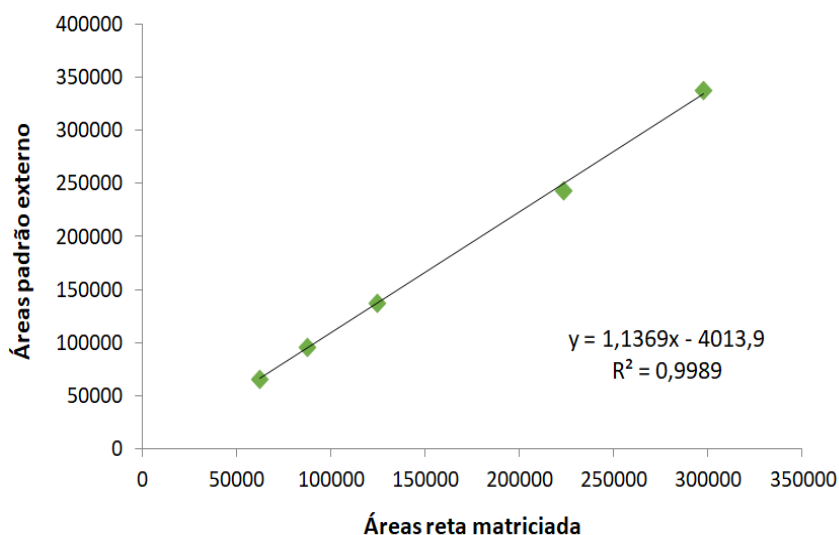


Figura 17: Correlação das áreas obtidas na análise da cafeína por HPLC-UV recorrendo a dois métodos de quantificação, método do padrão externo e reta matriciada. Análise de cinco níveis de concentração do intervalo linear (0,5 mg/L; 0,7 mg/L; 1,0 mg/L; 1,8 mg/L e 2,4 mg/L).

1.5.2. Método de adição de *surrogate*

Selecionou-se o hidroximetilfurfural (HMF) dado que este composto é um subproduto do aquecimento dos hidratos de carbono e devido a essa característica, ele está ausente nas amostras de bivalves (262). Consequentemente, através da deteção do HMF por cromatografia líquida, a totalidade da área obtida no cromatograma corresponde à quantidade adicionada no pré-tratamento das amostras (QuEChERS).

Para se poder recorrer ao HMF como *surrogate* e para avaliar a concentração adicionada, também se avaliou a resposta instrumental (HPLC-UV) em função da concentração de HMF, numa gama de concentração entre 1 mg/L e 16 mg/L. As concentrações selecionadas basearam-se em injeções individuais do padrão de HMF e na avaliação de picos cromatográficos com áreas semelhantes às obtidas para a cafeína no intervalo de concentração estudada. A reta de calibração do HMF por HPLC-UV apresenta um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9993 e um coeficiente de determinação (CV_m) de 2,3%.

A recuperação da cafeína com recurso à adição de *surrogate* é de 82% com um desvio padrão relativo de 7% ($n=4$).

1.6. Limiares analíticos do método global

Com base nos valores de recuperação obtidos, o limite de deteção e de quantificação do método global (MDL e MQL) foram de 0,36 µg/g e 1,2 µg/g, respetivamente.

Não foram encontrados estudos prévios da análise da cafeína em moluscos bivalves por HPLC-UV. Grande parte dos trabalhos já realizados nesta matriz, o método utilizado é o LC-MS/MS e, na maioria dos casos, os analitos são outros compostos, a maioria fármacos que não a cafeína, como por exemplo, o paracetamol, o ibuprofeno, naproxeno ou a carbamazepina. Cueva-Mestanza *et al.* (2008) realizou a análise de fármacos em moluscos bivalves pelo método de HPLC-UV, apesar da cafeína não se encontrar entre os compostos analisados (226).

1.7. Controlo de qualidade interno

Como a concentração de cafeína nas amostras de moluscos bivalves foi sempre inferior ao MDL (0,36 µg/g) não foi possível a análise de duplicados.

2. Caracterização ambiental dos locais de amostragem

A Tabela 20 apresenta uma caracterização *in situ* dos locais de amostragem bem como a sua localização geográfica.

Tabela 20: Pontos de amostragem das águas marinhas e caracterização físico-química das mesmas (ensaios *in situ*).

Local	Código	Data e hora	Ponto GPS	T (°C)	Sal	pH	O ₂ , mg/L	O ₂ , % Sat
Alvor #1	A1	27/10/2018 9h42	37.132398,-8.622875	18,9	36,2	7,66	7,6	102
Alvor #2	A2	27/10/2018 11h00	37.145181,-8.624896	19,6	35,4	7,51	5,1	68,9
Praia de Faro	B1	25/10/2018 8h25	37.008499,-7.994345	19,7	36,5	7,48	6,2	84,4
Ramalhete	B2	25/10/2018 9h25	37.004941,-7.967467	20,1	36,7	7,52	6,2	84,3
Ludo	B3	25/10/2018 10h15	37.016045,-7.990925	20,5	38,8	7,43	6,5	90,7
Tavira	T1	30/10/2018 10h52	37.114472,-7.631951	16,2	35,6	7,88	9,5	120
Olhão	O1	30/10/2018 12h25	37.114472,-7.631951	19,1	36,5	8,51	9,5	127

3. Análise de cafeína em amostras de água por QuEChERS-HPLC-MS/MS

Para avaliar o impacto das águas marinhas na bioconcentração da cafeína e/ou outros xenobióticos nos moluscos bivalves, também se analisaram as águas marinhas dos sete locais de amostragem. A análise foi efetuada por extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida associada à espectrometria de massa tandem (HPLC-MS/MS). O método de QuEChERS-HPLC-MS/MS foi validado para a análise de 24 fármacos e hormonas (143). Como o método apresenta um limiar analítico cerca de 1000 vezes inferior ao método de HPLC-UV, também foram analisadas várias amostras de bivalves para quantificação destes compostos alvo.

A Tabela 21 sumariza os resultados obtidos para as águas marinhas. Todos os compostos com concentração acima do limite de deteção (LD) foram quantificados (amostras positivas). Os fármacos que não se encontram representados na Tabela situaram-se abaixo do limite de deteção em todas as amostras analisadas.

Como ilustrado na Tabela 21, nas águas analisadas dos sete locais de amostragem, a cafeína foi o único fármaco em estudo que foi detetado e quantificado acima do limite de quantificação (LQ) em todas as amostras. Dos 24 compostos analisados, foram detetados apenas 4 compostos e, com exceção da cafeína, estavam presentes em concentrações muito baixas (entre o LD e LQ), o que é um bom indicador da baixa contaminação das águas marinhas dos locais em estudo. O paracetamol, um dos fármacos mais reportados em estudos de ocorrência, foi detetado apenas em três locais, registando o valor mais elevado na Praia de Faro. Relativamente ao naproxeno e à testosterona, foram encontrados na Praia de Faro e Alvor #1, respetivamente.

Apesar da existência de inúmeros estudos da ocorrência de fármacos em vários ecossistemas marinhos, muitos deles são realizados em zonas onde é expectável ocorrer a contaminação das águas adjacentes, como locais junto de pontos de descarga de efluentes, estuários, zonas costeiras de elevada densidade populacional e/ou com elevado tráfego marítimo e portos. Weigel *et al.* (2002), realizou um estudo em vários locais do Mar do Norte, no qual determinou a concentração de vários fármacos como a cafeína, diclofenac, ibuprofeno, entre outros. Para a cafeína, os autores obtiveram amostras positivas de todos os locais de amostragem, com variações entre os 2 ng/L e 16 ng/L (263).

Kurissery *et al.* (2012) sumariza vários estudos já realizados, os quais determinaram a concentração de cafeína em águas marinhas. Nos Estados Unidos, foram realizados quatro estudos que reportaram concentração de cafeína de 4,4 µg/L a 6,3 µg/L, de 134 µg/L a 357 µg/L, de 6 a 41 ng/L e de 5 ng/L a 1,6 µg/L. Já no Canadá foram reportados valores entre os 5 ng/L e 149 ng/L (264).

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com outros estudos já publicados para as águas marinhas, pode-se inferir que os valores de cafeína variam muito consoante o local de amostragem. Porém, os resultados obtidos neste trabalho são muito inferiores aos reportados por Kurissery *et al.* (2012) nos Estados Unidos e superiores aos de Weigel *et al.* (2002) em relativos ao Mar do Norte (263,264).

Tabela 21: Fármacos e hormonas detetados nas águas marinhas em vários locais de amostragem e analisados por HPLC-MS/MS.

Matriz	Local	Composto			
		Paracetamol	Cafeína	Naproxeno	Testosterona
Concentração (ng/L)					
Águas marinhas	Alvor #1	5,7	18	< LOD	2,5
	Alvor #2	2,9	67	< LOD	< LOD
	Praia de Faro	12	64	7,2	< LOD
	Ramalhete	< LOD	43	< LOD	< LOD
	Ludo	< LOD	39	< LOD	< LOD
	Olhão	< LOD	83	< LOD	< LOD
	Tavira	< LOD	46	< LOD	< LOD

4. Análise de moluscos bivalves

Os resultados para os vários parâmetros analisados são, sempre que possível, apresentados no mesmo gráfico e agrupados por variedade de molusco bivalves, nomeadamente, amêijoia (Amj), berbigão (Berb), lambujinha (Lamb), ligueirão (Lig), mexilhão (Mex) e ostra (Ost).

4.1. Caracterização morfométrica

A Tabela 22 apresenta a caracterização morfométrica (comprimento, largura e espessura) e a massa média dos moluscos bivalves em estudo.

Tabela 22: Caracterização morfométrica dos moluscos bivalves em estudo: massa, comprimento, largura e espessura.

Bivalve	Local	n	Massa Total (g ± DP)	Massa casca (g ± DP)	Massa edível (g ± DP)	Comprimento (cm ± DP)	Largura (cm ± DP)	Espessura (cm ± DP)
Amêijoia-boa	Alvor #1	22	10,7 ± 3,54	6,41 ± 1,92	4,34 ± 1,76	3,77 ± 0,35	2,67 ± 0,31	1,95 ± 0,30
	Alvor #2	4	4,83 ± 1,01	3,05 ± 0,72	1,78 ± 0,45	2,89 ± 0,14	2,13 ± 0,11	1,39 ± 0,11
	Olhão	46	3,56 ± 1,01	1,95 ± 0,50	1,61 ± 0,54	2,71 ± 0,25	1,93 ± 0,19	1,25 ± 0,15
	Tavira	32	5,80 ± 3,33	3,57 ± 2,10	2,24 ± 1,28	3,11 ± 0,59	2,17 ± 0,45	1,51 ± 0,37
Amêijoia-boa Grande	Olhão	9	7,70 ± 2,05	4,43 ± 0,94	3,27 ± 1,24	3,49 ± 0,29	2,46 ± 0,18	1,63 ± 0,14
Berbigão	Alvor #1	7	2,30 ± 0,57	1,64 ± 0,45	0,66 ± 0,14	2,06 ± 0,23	1,81 ± 0,13	1,37 ± 0,13
	Alvor #2	92	3,24 ± 0,95	2,34 ± 0,59	0,90 ± 0,43	2,12 ± 0,19	1,85 ± 0,17	1,34 ± 0,16
	Ramalhete	24	4,21 ± 1,67	2,72 ± 0,95	1,50 ± 0,79	2,45 ± 0,41	2,05 ± 0,20	1,61 ± 0,22
Lambujinha	Olhão	15	3,50 ± 1,33	1,66 ± 0,49	1,84 ± 0,88	2,99 ± 0,26	2,40 ± 0,22	0,94 ± 0,08
	Tavira	16	3,70 ± 1,78	1,91 ± 1,13	1,79 ± 1,26	3,20 ± 0,31	2,51 ± 0,26	0,99 ± 0,11
Lingueirão	Alvor #1	28	9,64 ± 1,63	3,10 ± 0,58	6,54 ± 1,21	8,00 ± 0,47	1,31 ± 0,10	1,07 ± 0,12
Mexilhão	Ludo	25	8,81 ± 3,49	5,76 ± 2,16	3,05 ± 1,56	4,12 ± 0,67	2,44 ± 0,28	1,93 ± 0,33
	Praia de Faro	26	8,82 ± 2,00	5,70 ± 1,15	3,13 ± 1,02	4,15 ± 0,39	2,60 ± 0,25	1,80 ± 0,19
Ostra	Tavira	11	65,3 ± 13,3	53,0 ± 9,21	12,2 ± 6,82	7,99 ± 0,68	5,15 ± 0,51	3,44 ± 0,45

Com base nas massas de cada indivíduo (total, casca e parte edível), foram calculados o índice de condição (IC, %) e a razão de massas casca/edível. Os resultados estão apresentados na Figura 18. O número de réplicas por espécie variou entre 11 (Ost) e 123 (Berb), como se observa na Tabela 23.

Tabela 23: Data de amostragem dos moluscos bivalves e número de indivíduos por ponto de amostragem.

Local	Data de recolha	Amostra	Nº de indivíduos
Alvor #1	27/10/2018	Amêijoa Boa	22
		Berbigão	7
		Lingueirão	28
Alvor #2	27/10/2018	Amêijoa boa	4
		Berbigão	92
Praia de Faro	25/10/2018	Mexilhão	26
Ramalhete	25/10/2018	Berbigão	24
Ludo	25/10/2018	Mexilhão	25
Tavira	30/10/2018	Amêijoa boa	32
		Lambujinha	16
		Ostra	11
Olhão	30/10/2018	Amêijoa boa grande	9
		Amêijoa boa pequena	46
		Lambujinha	15

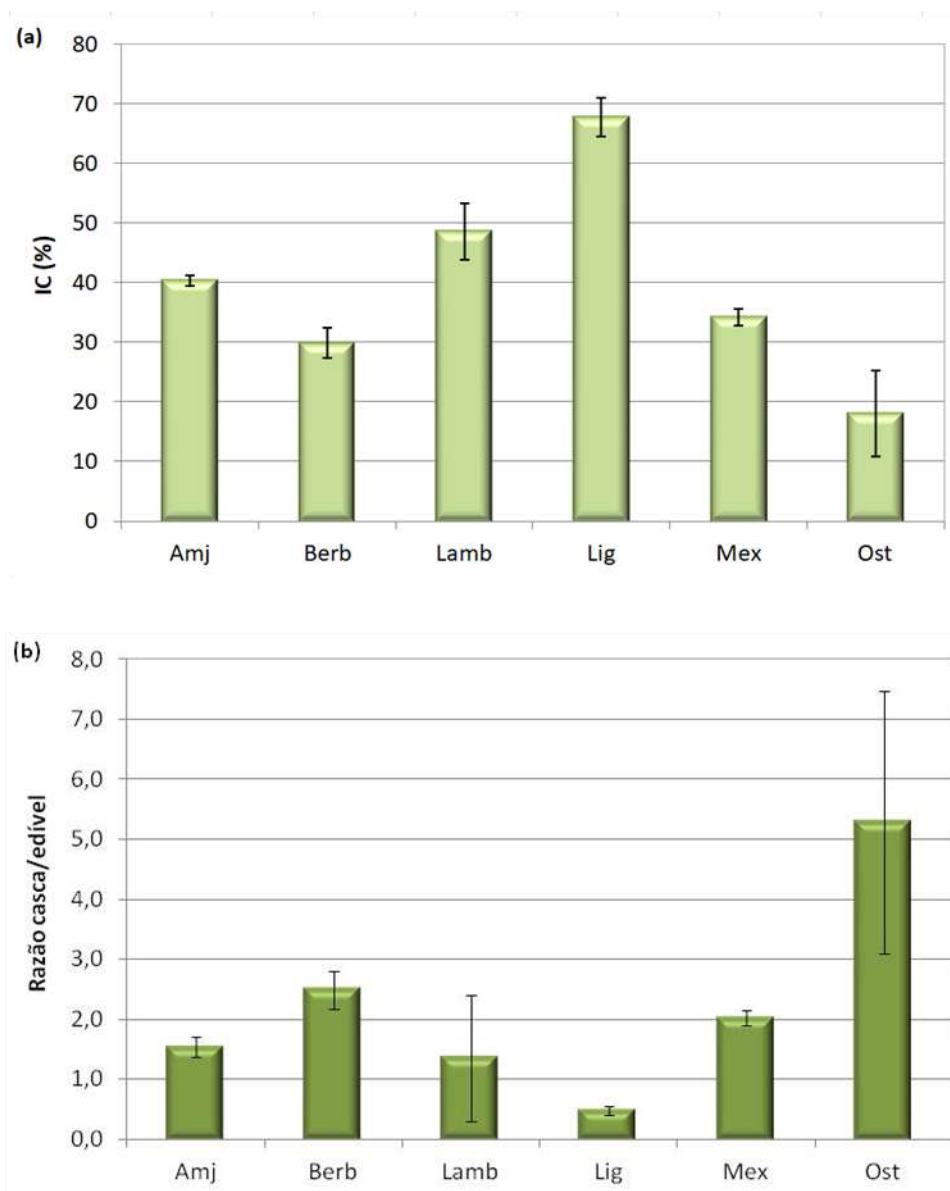


Figura 18: Índice de condição (a) e razão de massas casca/edível (b) de seis espécies de moluscos bivalves.

O índice de condição e a razão de massa casca/edível indicam o estado fisiológico individual e, nas condições ótimas, são característicos de cada espécie de moluscos bivalves. No entanto eles variam na razão inversa, isto é, quanto maior for o índice de condição menor será a razão de massas casca/edível, tal como observado na Figura 18. Os moluscos bivalves, em condições de *stress*, tendem a perder massa corporal, ou seja, verifica-se um aumento da razão de massa casca/edível e uma diminuição do índice de condição. Este *stress* pode ser causado por fatores ambientais (temperatura, salinidade, oxigénio dissolvido ou pH) e condições antropogénicas associadas à contaminação do meio ambiente.

O IC apresentou um perfil decrescente entre os vários bivalves (Lig, Lamb, Amj, Mex, Berb e Ost) com valores entre 18% (Ost) e 68% (Lig). Os valores de IC apresentam desvios-padrão relativos (DPR%) inferiores a 5%, à exceção dos valores de IC da ostra, do berbigão e da lambujinha com DPR de 40%, 8,5% e 9,7%, respetivamente.

Para avaliar a variabilidade do IC em função dos diferentes pontos de amostragem ou recolha dos bivalves, avaliou-se o IC dos moluscos por ponto de amostragem (Figura 19). Como o ligueirão e a ostra só tiveram um local de amostragem, eles não estão representados na Figura 19.

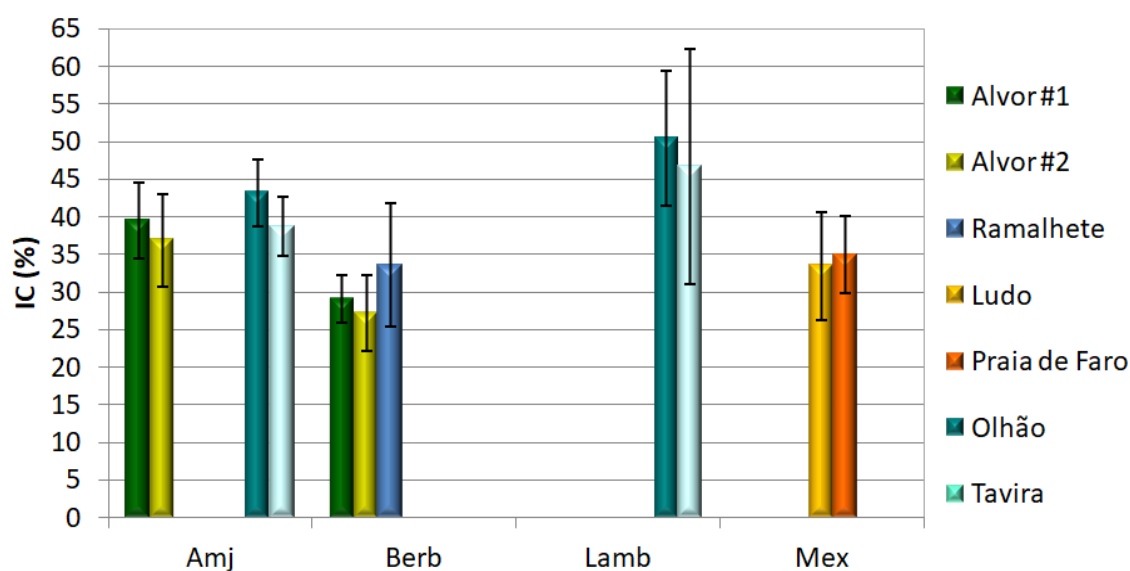


Figura 19: Índice de condição dos vários moluscos bivalves distribuídos pelos locais de amostragem.

As espécies que apresentaram maior variabilidade do IC em função do local de amostragem foram a amêijoia-boia e o berbigão. As lambujinhas (Olhão e Tavira) e os mexilhões (Ludo e Praia de Faro) não apresentaram diferenças significativas entre os dois locais de amostragem ($p > 0,05$).

No caso das amêijoas e dos berbigões os valores de IC apresentaram diferenças estatisticamente significativas com o local de amostragem ($p < 0,05$). As amêijoas de Olhão têm um IC significativamente superior (44%) às dos restantes pontos de amostragem (Alvor #1, Alvor #2 e Tavira) que apresentaram um IC médio de 39%. Entre estes três pontos de amostragem não há diferenças significativas. No caso dos berbigões,

o IC é superior no Ramalhete (34%) do que nos pontos de amostragem da Ria de Alvor (27%). Entre estes os pontos de amostragem de Alvor não há diferenças significativas ($p > 0,05$).

Logo, para a maioria dos moluscos bivalves em estudo há uma baixa variabilidade do IC intra-específico e entre os locais de amostragem.

Comparando os resultados obtidos com os IC calculados por Cravo *et al.* (2012) relativos a amêijoas e Ria Formosa (Portugal) e Campillo *et al.* (2013) e para amêijoas provenientes do Mar Menor (Espanha), aparentemente parece ter ocorrido um aumento dos IC dos moluscos em estudo. Cravo *et al.* (2012) obteve índices de condição que variam aproximadamente entre 7% e 16% (237) e Campillo *et al.* (2013) valores entre 8% e 10% (265).

No entanto, os IC determinados nos três estudos foram calculados de forma diferente. Cravo *et al.* (237) determinaram o IC com base na massa edível seca e na massa seca da concha e Campillo *et al.* (265) determinaram o IC com base na massa edível seca e na massa total seca (massa seca da concha e da parte edível). Para termos dados comparáveis também se determinou os IC para os moluscos bivalves pelos métodos referidos por ambos os autores.

De acordo com o método de cálculo de Cravo *et al.*, o IC para os moluscos bivalves em estudo variaram entre 4% e 34% (Amj: 9%; Berb: 11%; Lig: 34%; Mex: 9%; Ost: 4%). Com o IC corrigido e calculado de igual forma, com exceção do lingueirão e da ostra, obtiveram-se resultados semelhantes aos reportados por Cravo *et al.* (237).

De acordo com o método de cálculo de Campillo *et al.* (265), o IC para os moluscos bivalves em estudo variaram entre 4% e 25% (Amj: 8%; Berb: 10%; Lig: 25%; Mex: 8%; Ost: 4%). Há semelhança com o estudo anterior, também foram obtidos resultados semelhantes aos reportados pelos autores com exceção do lingueirão e da ostra.

Os mexilhões considerados num estudo realizado por Almeida *et al.* ao longo da costa algarvia em 2011, reportaram valores médios de IC entre os 7% e 21% (245). O método de cálculo do IC foi idêntico ao realizado por Cravo *et al.* (237). No presente estudo, obtiveram-se valores de IC para os mexilhões de cerca de 9%, os quais são concordantes com os reportados por Almeida *et al.* (2011).

4.2. Caracterização nutricional

Foram analisados vários parâmetros nutricionais nomeadamente teor em cinza e em humidade, proteína bruta, matéria gorda total e hidratos de carbono dos moluscos bivalves. Devido ao número reduzido de indivíduos de algumas amostras e à toma mínima de amostra para alguns ensaios, não foi possível analisar nem todas as espécies, nem todos os parâmetros. Consequentemente, o número de réplicas analisada por cada parâmetro e/ou por cada espécie é variável. Por sua vez, o tratamento estatístico dos resultados intra-específicos só foi realizado para a amêijoia, dado que foram avaliadas várias réplicas de vários locais de amostragem para este molusco bivalve.

Para a determinação dos vários parâmetros (teor de humidade, cinza, proteína, matéria gorda total e hidratos de carbono) analisaram-se moluscos bivalves de locais diferentes: amêijoas (Olhão, Alvor #1 e Tavira), mexilhões (Ludo e Praia de Faro), ostras (Tavira), berbigão (Alvor #2) e lingueirão (Alvor #1).

4.2.1. Teor de humidade

A Figura 20 apresenta o teor de humidade das cinco espécies de moluscos bivalves.

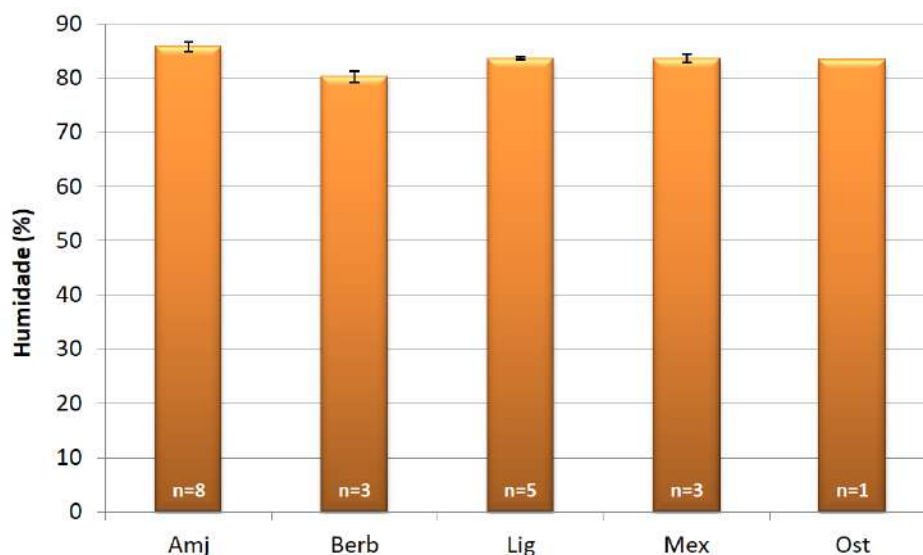


Figura 20: Teor de humidade dos moluscos bivalves: amêijoia, berbigão, lingueirão, mexilhão e ostra.

O teor de humidade representa a quantidade de água existente em cada indivíduo. Os moluscos bivalves são muito ricos em água ($\geq 80\%$), a qual é responsável pela maioria da

massa corporal dos indivíduos. A proporção de água entre as diferentes espécies é muito semelhante, com variação entre os 80% e os 87%. Logo, o seu teor em matéria seca está compreendido entre 13% (amêijoa) e 20% (berbigão).

Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o teor de humidade do lingueirão, mexilhão e ostra ($p > 0,05$). Porém, tanto a amêijoa como o berbigão apresentaram diferenças significativas em relação às restantes espécies de moluscos bivalves e também quando comparados entre si ($p < 0,05$).

No caso da amêijoa-boia, a humidade apresentou diferenças estatisticamente significativas entre si ($p < 0,05$) para os vários locais de amostragem analisados (Alvor #1, Olhão e Tavira), apesar apresentar um desvio padrão relativo muito baixo (1%). O teor de humidade (%) da amêijoa de Tavira (87,4%) é significativamente mais elevado que a amêijoa de Alvor #1 (85,0%) e de Olhão (85,8%). Relativamente aos restantes bivalves, verificou-se uma boa homogeneidade de resultados intraespecíficos com desvios padrão relativos inferiores a 2%.

Comparando os resultados obtidos com os da Tabela de composição de alimentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) (Capítulo II, Tabela 3) podemos verificar que os valores são muito semelhantes. No entanto, a variabilidade entre bivalves é diferente. Nos moluscos bivalves analisados o perfil crescente de humidade é: Berbigão (80%) < Ostra (84%) < Mexilhão (84%) < Lingleirão (84%) < Amêijoa (86%). Na tabela do INSA o perfil crescente é Amêijoa (81%) < Berbigão (83%) < Mexilhão (83%) < Ostra (83%). Esta tabela não apresenta valores para o lingueirão.

4.2.2. Cinza

A Figura 21 apresenta o teor de cinzas de quatro espécies de moluscos bivalves. Devido a perda de amostra, a cinza não foi determinada no berbigão.

A cinza representa a composição mineral dos alimentos, ou seja, a matéria inorgânica remanescente após a carbonização e incineração da matéria orgânica. A espécie mais rica em matéria inorgânica é o mexilhão (3,6%), seguido da amêijoa e da ostra com teores de cinza muito semelhantes (3,2 %).

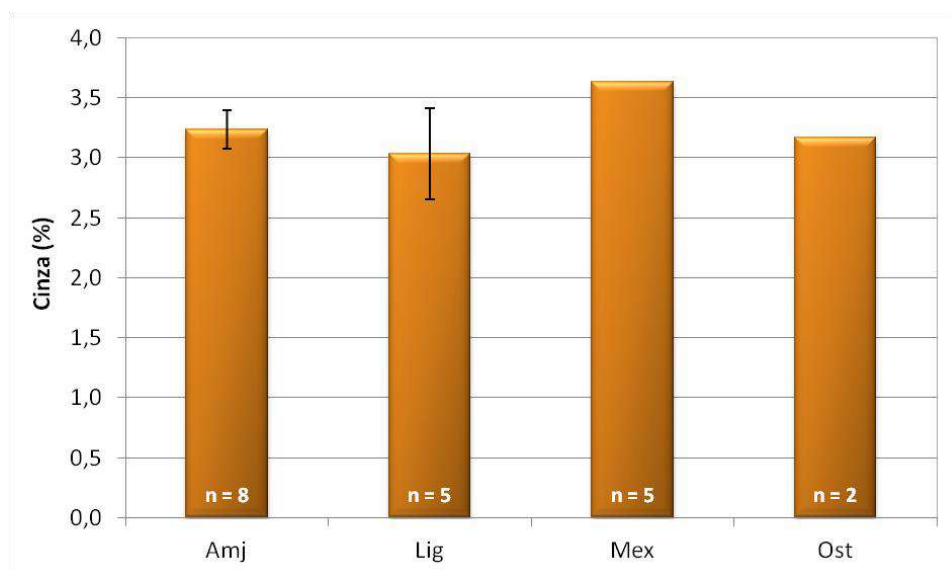


Figura 21: Teor de cinza de vários moluscos bivalves: amêijoia, lingueirão, mexilhão e ostra.

Contudo, as várias espécies de moluscos bivalves em estudo foram similares, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre si para o teor de cinza ($p > 0,05$).

Identicamente ao parâmetro da humidade, o teor de cinza da amêijoia apresentou diferenças significativas para os diferentes locais de amostragem. Tavira apresentou os valores em cinza mais baixos, com uma média de 3 %, diferindo de Alvor #1 (3,4%) e Olhão (3,3%).

O mexilhão foi o bivalve com resultados mais heterogêneos (4,4% e 2,8%), embora pouco conclusivos porque temos dois resultados, um de cada local de amostragem.

No lingueirão o teor em cinza foi de 3,0% com desvio padrão relativo de 12,5%. Como as várias réplicas pertencem ao mesmo local, a variabilidade existente deve-se às variações individuais dentro da mesma população.

Devido à limitação na quantidade de amostra de ostras, só foi possível analisar um indivíduo (cinza, 3,2%).

4.2.3. Proteínas

A Figura 22 apresenta o teor de proteínas de cinco espécies de moluscos bivalves.

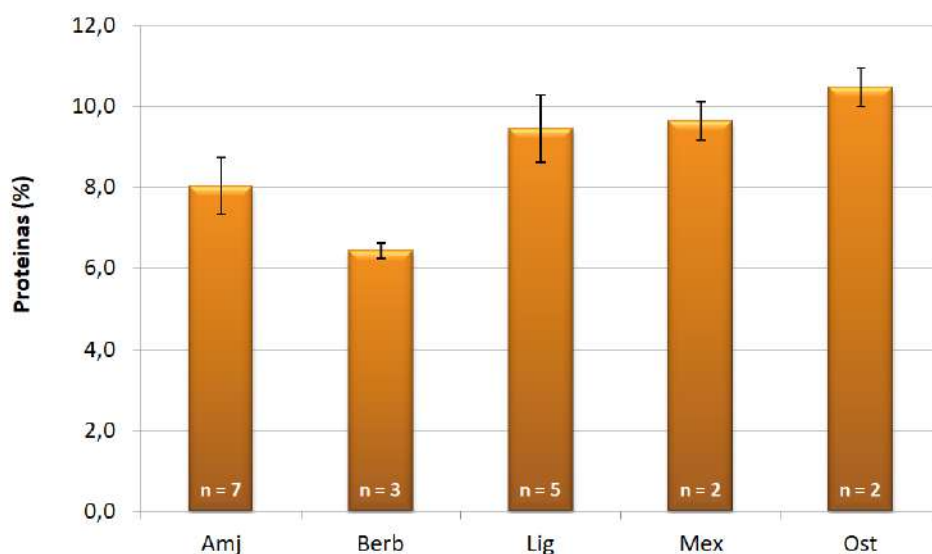


Figura 22: Teor de proteínas de vários moluscos bivalves: amêijoia, berbigão, lingueirão, mexilhão e ostra.

Os teores em proteína nos moluscos bivalves variaram entre 6,4% (berbigão) e 10,5% (ostra). A ostra é a espécie de bivalves com maior teor proteico, seguida do mexilhão (9,6%), lingueirão (9,5%) e amêijoia-boia (8,0%). Os desvios padrão relativos foram inferiores a 5% em todas as espécies, com exceção da amêijoia e do lingueirão, registando valores de 8,8% e 8,5%, respetivamente. Como o lingueirão pertencem ao mesmo local, o desvio padrão refere-se à variabilidade intra-populacional.

Entre as cinco espécies de bivalves, as únicas que não apresentaram diferenças significativas entre si no teor de proteína foram o lingueirão e o mexilhão e o mexilhão e a ostra ($p > 0,05$).

As amêijoas analisadas apresentam uma diferença estatisticamente significativa entre os três locais de amostragem ($p < 0,05$), mais elevada em Olhão e mais baixa em Tavira.

Os valores obtidos são inferiores aos valores apresentados na tabela de composição de alimentos do INSA, 9% (ostra) e 12% (mexilhão) (Capítulo II, Tabela 3), principalmente para o berbigão, cujo valor tabelado é de 10,5%. Nas ostras, o teor em proteína na tabela do INSA é de 8,6% e neste estudo obteve-se 10,5%. A representatividade dentro dos moluscos também é diferente. Relativamente ao teor de proteína, a ostra é o molusco

mais representativo dos resultados obtidos, enquanto na tabela do INSA, foi o menos representativo.

4.2.4. Matéria gorda total

A Figura 23 apresenta o teor de matéria gorda total nas cinco espécies de moluscos bivalves.

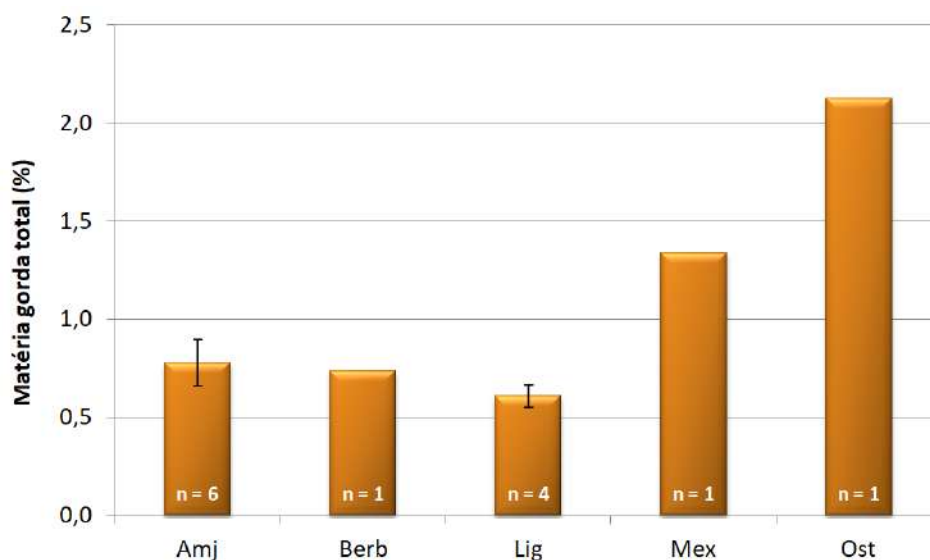


Figura 23: Teor de matéria gorda total de vários moluscos bivalves: amêijo-a, berbigão, lingueirão, mexilhão e ostra.

A matéria gorda total ou os lípidos representam a massa gorda ou a gordura de um organismo. Os moluscos bivalves são considerados produtos de pesca magros, com níveis de gordura baixos. Devido à maior massa necessária para a realização da caracterização da matéria gorda total e ao reduzido número de indivíduos de alguns moluscos, apenas foi realizado mais do que um ensaio para a amêijo-a e o lingueirão.

Como ilustrado na Figura 23, os resultados obtidos confirmam que as espécies analisadas estão entre os produtos de pesca magros, apresentando valores de matéria gorda total inferiores a 3%. A espécie com o teor de matéria gorda total mais elevado é a ostra (2,1%), seguido do mexilhão (1,3%), da amêijo-a (0,8%), do berbigão (0,7%) e do lingueirão (0,6%). O desvio padrão para a amêijo-a e o lingueirão foi elevado, com um DPR de 14% e 7%, respectivamente. O valor de DPR da amêijo-a deve-se à variabilidade entre locais de amostragem enquanto o DPR do lingueirão representa a variabilidade intra-populacional.

As cinco espécies de moluscos bivalves apresentam diferenças estatisticamente significativas relativamente à matéria gorda ($p < 0,05$). Porém, como se observa na Figura 23, os teores de matéria gorda total da amêijoia-bou, do berbigão e do lingueirão são muito próximos, não apresentando diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Comparando os resultados obtidos com os que são apresentados na Tabela de composição de alimentos (Capítulo II, Tabela 3), os valores são concordantes e semelhantes entre eles, com exceção da ostra. Apesar da ostra representar o grupo de bivalves com maior teor de matéria gorda tanto, na tabela fornecida pelo INSA como nos indivíduos analisados, a tabela de composição de alimentos indica valores menores (1,7%) que os obtidos neste estudo (2,1%). Alguns autores afirmam que uma das características dos moluscos bivalves é possuírem valores lipídicos inferiores a 2% (13). As espécies analisadas encontram-se todas abaixo dos 2% exceto as ostras, porém o valor obtido deste grupo é muito próximo dos 2%, podendo ser considerado um produto de pesca magro.

4.2.5. Hidratos de carbono

A Figura 24 apresenta o teor de hidratos de carbono de quatro espécies de moluscos bivalves.

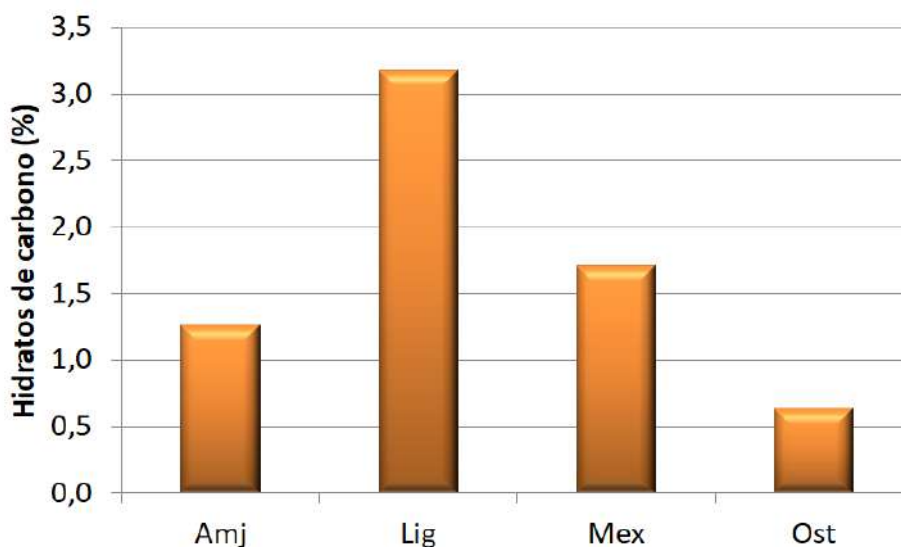


Figura 24: Teor de hidratos de carbono de vários moluscos bivalves: amêijoia, berbigão, lingueirão, mexilhão e ostra.

Os hidratos de carbono foram calculados através da diferença entre a massa seca e os macronutrientes avaliados, nomeadamente, água, cinza, proteína e matéria gorda. Como observado na Figura 24, os valores obtidos variaram entre os 0,7% e os 3,2%. A variedade de moluscos bivalves que possui maior teor em hidratos de carbono é o lingueirão (3,2%), seguido da amêijoia-boia (1,9%), do mexilhão (1,7%) e da ostra (0,7%).

Os valores obtidos são da mesma ordem de grandeza dos apresentados na tabela do INSA, onde os teores de hidratos de carbono para a amêijoia, o mexilhão e a ostra são de 2,6%, 2,0% e 3,9%, respetivamente. Apesar do lingueirão não estar representado na tabela de composição de alimentos, era expectável que apresentasse valores de hidratos de carbono muito superiores às restantes variedades de moluscos bivalves. Nos seres vivos, os hidratos de carbono podem ser armazenados sob a forma de energia de reserva (glicogénio). Sabe-se que o lingueirão possui um ciclo reprodutor característico e distinto dos outros bivalves com um tempo de desenvolvimento embrionário muito curto devido às elevadas reservas energéticas que possuem (93) .

Nas espécies analisadas, a ostra é a que tem o menor conteúdo em hidratos de carbono (0,7%) contrariamente à informação dada pelo INSA, onde a ostra representa o grupo com o teor de hidratos de carbono mais elevado (3,6%). No entanto, podemos estar a comparar valores de espécies diferentes e também pode haver baixa representatividade das amostras dado o limitado número de réplicas. Convém salientar ainda que esta determinação dos hidratos de carbono por cálculo, dá valores por aproximação, cujos valores são aferidos pelas determinações individuais de cada parâmetro que está na fórmula de cálculo (Equação 6).

4.2.6. Controlo de qualidade interno

No decorrer da análise dos vários parâmetros nutricionais realizam-se algumas determinações para avaliar a precisão e a veracidade dos resultados obtidos. A Tabela 24 apresenta um resumo da análise de duplicados e dos ensaios de recuperação.

A diferença de duplicados, com a exceção de uma série de trabalho da determinação da matéria gorda, apresentou sempre valores inferiores a 10% indicando que o método é preciso no decorrer dos ensaios de rotina.

A recuperação da fenilalanina na determinação da proteína pelo método Kjeldahl apresentou valores médios de 104%, com um desvio padrão relativo de 1,9% para as várias matrizes em estudo, indicando que o método é exato (boa veracidade e precisão).

Tabela 24: Análise de duplicados e ensaios de recuperação efetuados no decorrer do controlo de qualidade interno nas várias séries de trabalho.

	Humidade	Cinza	Proteínas	Mat. Gorda
DD%	0,7	1,9	0,0	9,1
	0,6	2,7	1,2	2,9
	0,2	0,3	2,9	5,2
	0,4	0,3	1,5	12
	0,8	---	0,0	---
	0,2	---	3,2	---
	0,3	---	6,7	---
	---	---	2,9	---
Rec (DPR,n)	---	---	104% (1,9%, 14)	---

5. Quantificação da cafeína nas amostras por QuEChERS-HPLC-UV

Todas as amostras de bivalves analisadas por QuEChERS-HPLC-UV apresentaram valores inferiores ao MDL (0,36 µg/g). Os extratos de algumas amostras também foram analisados por QuEChERS-HPLC-MS/MS (Capítulo VI, secção 6).

6. Análise de cafeína em amostras de bivalves por QuEChERS-HPLC-MS/MS

Dos 24 compostos analisados nos bivalves estudados, apenas a cafeína foi detetada na análise das amostras por HPLC-MS/MS. A amêijoia grande, distinta das restantes amêijoas pela sua elevada massa total e edível, tal como a ostra, não revelaram a presença deste composto nos seus tecidos. As restantes amostras foram positivas para a cafeína, com valores acima do limite de quantificação, exceto o mexilhão do Ludo (Tabela 25). Os valores situam-se todos na mesma ordem de grandeza, porém o lingueirão,

caracterizado por viver enterrado no sedimento, apresenta valores muito mais elevados de cafeína (5,7 ng/g) comparativamente aos restantes (variação de 0,27 ng/g a 1,7 ng/g). No entanto, é de salientar que foi analisado apenas um indivíduo de lingueirão, consequentemente, a representatividade é muito baixa. As amostras analisadas resultam de uma amostra composta de vários indivíduos da mesma espécie, representada por “n” na Tabela 25. Face a estes resultados, conclui-se que o método HPLC-UV validado e utilizado na leitura das amostras de bivalves, não apresentava os requisitos necessários para detetar e quantificar concentrações de cafeína tão baixas como aquelas reportadas através do método HPLC-MS/MS. O MDL para a análise de cafeína em moluscos bivalves por HPLC-UV foi de 0,36 µg/g, enquanto os resultados da cafeína que foram obtidos para os mesmos organismos, por HPCL-MS/MS, situam-se na ordem dos ng/g.

Tabela 25: Fármacos detetados nos moluscos bivalves dos locais de amostragem através do método HPLC-MS/MS.

Matriz	Local	Cafeína, ng/g (n)
Amêijoa-boa grande	Olhão	< MDL (3)
Amêijoa-boa pequena	Olhão	0,57 (31)
Amêijoa-boa	Tavira	0,98 (3)
Lambujinha	Tavira	1,2 (4)
	Olhão	1,7 (5)
Berbigão	Alvor #2	0,65 (77)
	Ramalhete	1,6 (5)
Lingueirão	Alvor #1	5,7 (1)
Mexilhão	Praia de Faro	0,69 (11)
	Ludo	0,27 (3)
Ostra	Tavira	< MDL (1)

A cafeína é um ácido fraco e para o pH das águas marinhas ($7 < \text{pH} < 8$) ela encontra-se na forma ionizada, portanto, mais solúvel em água. Consequentemente, a sua adsorção nos sedimentos e a sua adsorção pelos tecidos dos moluscos bivalves é baixa. Devido à sua libertação contínua no ambiente (consumo de café, chá, refrigerantes, entre outros), ao seu pKa e à sua elevada solubilidade (13,5 g/L), a cafeína é um xenobiótico

frequentemente encontrado nas águas marinhas e consequentemente a sua adsorção nos sedimentos, embora baixa, é contínua. Deste modo, é expectável que para os moluscos bivalves detritívoros a bioacessibilidade da cafeína seja maior e a concentração nos moluscos bivalves também seja maior (205,266).

Dos vários moluscos bivalves, a lambujinha e o lingueirão foram os que apresentaram uma concentração maior de cafeína, embora apenas as lambujinhas sejam detritívoras. No entanto, o lingueirão vive enterrado no sedimento (cerca de 10 cm) e consequentemente por remobilização de sedimento ou sua bioturbação a água filtrada junto deste sedimento, onde se acumulam naturalmente os xenobióticos, pode ser enriquecida em material em suspensão, o qual poderá mais rico em cafeína do que a água marinha.

As amêijoas e os berbigões, embora habitem no sedimento, filtram a água através dos sífões, e consequentemente a biodisponibilidade da cafeína é menor. O mexilhão e a ostra filtram normalmente água de locais acima do sedimento, onde a taxa de acumulação de xenobióticos é normalmente potenciada.

Globalmente, existe uma correlação positiva ($r = 0,78$) entre a concentração de cafeína e o índice de condição (IC) para as várias espécies de moluscos bivalves pertencentes a vários locais, o que significa que os indivíduos mais robustos são os que bioacumulam mais cafeína. Logo, nas concentrações encontradas, a cafeína isoladamente não é um fator de *stress* e não justifica as variações do IC para os vários moluscos bivalves.

Individualmente, apenas as amêijoas de Olhão e Tavira contrariam este perfil. Há uma forte correlação negativa ($r = -0,98$) entre a cafeína e o IC nas amêijoas de Tavira e Olhão. As amêijoas de Tavira apresentam uma concentração de cafeína de cerca de duas vezes superior às amêijoas de Olhão e estas últimas, apresentam um IC muito superior ao registado em Tavira, sugerindo maior robustez física. Neste caso, a cafeína pode ser um dos fatores de *stress* ou os indivíduos em maior *stress* fisiológico em Tavira têm a capacidade de acumular mais cafeína.

Rodrigues *et al.* (2019) analisou a cafeína presente em amêijoas provenientes da Ria Formosa (nomeadamente Olhão em 2016 e Faro em 2017) pelo mesmo método e foram registados valores médios de 4 ng/g amostra em 2016 e 1,6 ng/g amostra em 2017 (143).

O valor máximo nos moluscos bivalves em estudo, com exceção do lingueirão, foi de 1,7 ng/g amostra enquanto Rodrigues *et al.* (2019) registaram, em 2017, um valor máximo de cerca de 6,4 ng/g amostra. Embora os valores sejam muito diferentes, eles situam-se na mesma ordem de grandeza e estas variações estão associadas a vários fatores, nomeadamente, tamanho, peso e *stress* ambiental (em determinadas condições de temperatura, salinidade e oxigénio, os bivalves podem fechar as valvas e bioconcentrar menores quantidades de xenobiótico).

7. Biomarcadores de efeito

Para os três biomarcadores de efeito em estudo, foram realizados o mesmo número de ensaios por espécie e por local, para cada biomarcador. Contudo, o número de ensaios entre as várias espécies de bivalves é variável devido ao reduzido número de algumas amostras. Contrariamente aos restantes parâmetros analisados no âmbito da tese, por cada ensaio analisou-se um indivíduo no seu todo e não uma fração derivada da homogeneização de vários indivíduos da mesma amostra. Para a determinação da AChE e LPO foram analisadas duas réplicas por cada indivíduo e para o ETS foram realizadas três réplicas.

Para a determinação dos vários biomarcadores de efeito, analisaram-se moluscos bivalves de locais diferentes: amêijoas de Alvor #1, Alvor #2, Olhão e Tavira; berbigões de Alvor #1, Alvor #2 e Ramalhete; lambujinhas de Olhão e Tavira; lingueirões de Alvor #1; mexilhões do Ludo e Praia de Faro; e ostras de Tavira.

Não foi realizado o tratamento estatístico intraespecífico no lingueirão e na ostra, uma vez que todos os indivíduos analisados destas espécies de bivalves pertenciam ao mesmo local de amostragem.

7.1. Acetilcolinesterase (AChE)

Algumas lambujinhas (Olhão) e berbigões (Alvor #1) foram perdidos (3 e 2 indivíduos, respetivamente) pelo que se realizaram leituras diferentes do mesmo indivíduo.

A Figura 25 apresenta a atividade da AChE nas diferentes espécies de moluscos bivalves e por local de amostragem.

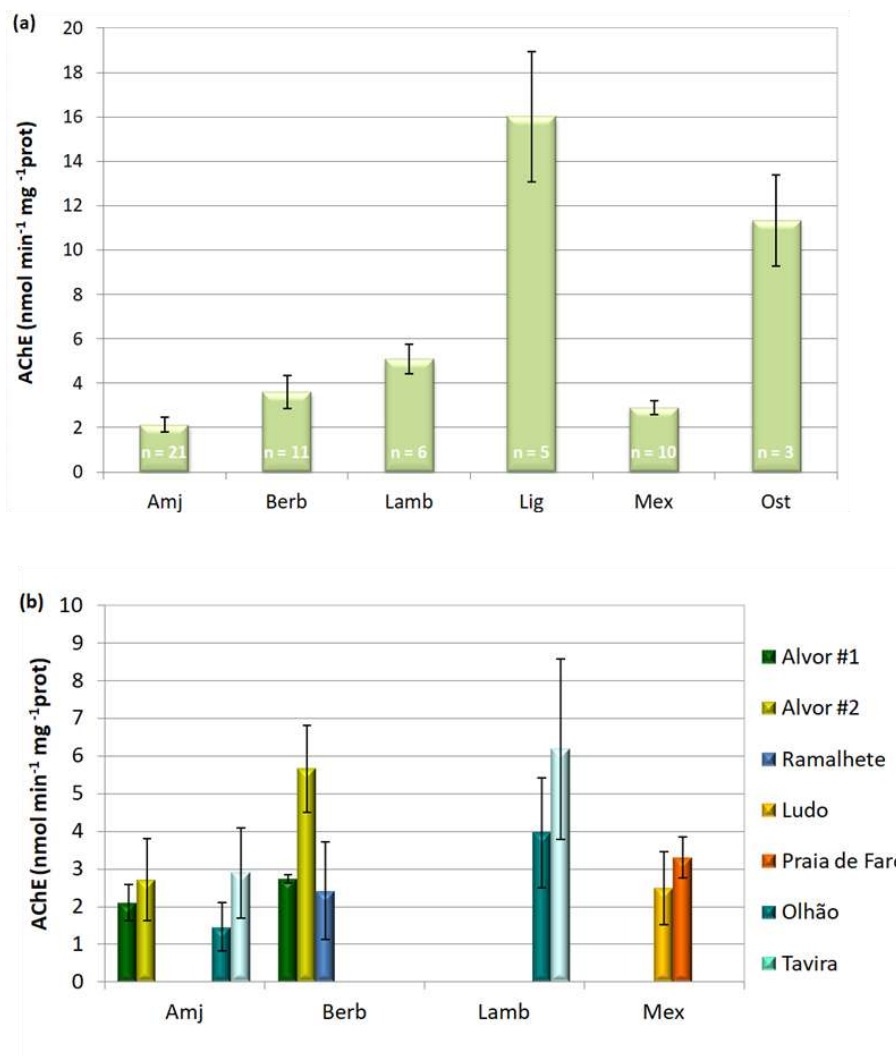


Figura 25: Atividade da acetilcolinesterase (AChE) por espécie (a) e por local de amostragem (b) dos moluscos bivalves em estudo.

Os baixos níveis de AChE podem indicar toxicidade neurológica dos indivíduos, uma vez que a presença de xenobióticos neurotóxicos no ambiente pode inibir a atividade da AChE.

Como se observa na Figura 25 (a), por ordem decrescente na atividade da acetilcolinesterase, estão o lingueirão (16 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot), a ostra (11 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot), a lambujinha (5 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot), o berbigão (4 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot), o mexilhão (3 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot) e, por último, a amêijoia (2 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot). Os

desvio-padrão relativos de cada espécie de bivalve foram elevados (>10%), com variações entre os 11% (mexilhão) e os 20% (berbigão).

Cada espécie, mesmo em condições ótimas, apresenta um valor de AChE próprio e diferente das restantes espécies. Consequentemente e como esperado, todas as variedades de moluscos bivalves obtiveram valores de atividade da AChE muito distintos, com diferenças estatisticamente significativas.

As amêijoas analisadas em quatro pontos de amostragem diferentes, não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$). O local onde foram determinadas a maior atividade da AChE foi em Tavira ($2,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$), seguida de Alvor #2 (com uma média de $2,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$), Alvor #1 ($2,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$) e Olhão ($1,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$) (Figura 25 (b)), o que pode sugerir Olhão como o local com maior presença de compostos inibidores da AChE, apesar da reduzida diferença relativamente aos outros locais.

Contrariamente às amêijoas, os berbigões apresentam diferenças estatisticamente significativas nos três locais de amostragem ($p < 0,05$). Como se observa na Figura 25 (b) os berbigões de Alvor #2 ($5,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$) manifestam uma atividade da AChE mais elevada que os outros dois locais, Alvor #1 ($2,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$) e Ramalhete ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$), que não apresentam diferenças significativas entre si e que sugerem uma maior contaminação ambiental por substâncias inibidoras da AChE no Ramalhete e Alvor #1 do que em Alvor #2.

As lambujinhas, à semelhança das amêijoas, também não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os locais de Olhão ($4,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$) e Tavira ($6,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$) ($p > 0,05$).

Os mexilhões do Ludo ($2,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$) e da Praia de Faro ($3,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}\text{prot}$) não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p > 0,05$).

A Figura 25 (a) pode sugerir que a espécie menos afetada pelo *stress* ambiental é o lingueirão e a mais afetada a amêijoa-boia. Na Tabela 26 (Capítulo VI, Secção 6) também se pode verificar que o lingueirão foi a espécie com a maior concentração de cafeína, em oposição à amêijoa-boia com a menor concentração de cafeína.

Para os moluscos bivalves em estudo (de várias origens), há uma forte correlação positiva entre a cafeína e a AChE ($r = 0,72$), com exceção da lambujinha e berbigão ($r = -1,0$), o que sugere que, globalmente, os níveis de cafeína não são suficientes elevados para inibir a AChE, exceto para a lambujinha e berbigão. As amêijoas e os mexilhões são as espécies que apresentam a maior correlação positiva entre a cafeína e a AChE ($r \approx 1$). Por outro lado também ocorre uma forte correlação positiva entre a AChE e o comprimento da espécie ($r=0,84$), o que mostra que os indivíduos maiores desenvolvem maior atividade da AChE.

Na mesma região onde foi realizado este trabalho, Ria Formosa (Portugal), Cravo *et al.* (2012), também avaliaram vários parâmetros das águas (metais e PAH's) e biomarcadores de efeito nas amêijoas. Também foram selecionados quatro locais de amostragem com características específicas. Os valores médios da medição da atividade da AChE não diferiram muito entre locais, apresentando variações médias entre 2,4 e 2,7 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}\text{prot}$. Os autores caracterizaram a zona, com base na análise dos parâmetros bioquímicos e dos contaminantes, e confirmaram que a região da Ria Formosa, durante o decorrer do estudo, não se encontrava com valores de contaminação elevados. Os locais onde Cravo *et al.* (2012) registaram valores mais baixos, o que se traduz num maior *stress* dos organismos, foi em locais próximos de estações de tratamento de águas e nos canais principais, onde ocorre frequentemente a entrada de água marinha. O estudo de Cravo *et al.* (2012) foi realizado ao longo de cerca de dois anos e, dado que as variações sazonais provocam alterações fisiológicas nos organismos, obtêm-se respostas mais facilmente comparáveis se a altura do ano coincidir em ambos os estudos. Assim, foram tidos em conta os valores obtidos em Outubro, uma vez que Cravo *et al.* (2012) dispõem dos dados desse período que corresponde ao período de apanha dos moluscos bivalves do nosso estudo. O estudo de Cravo *et al.* (2012) apresenta valores que variam entre os 1,2 e 1,9 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}\text{prot}$ (237). Comparando com os resultados obtidos nas amêijoas, estes são, na sua maioria, superiores aos obtidos em 2012, sugerindo que os organismos analisados neste estudo poderiam ter estado sob menor *stress* ambiental nos quatros locais de amostragem (Alvor #1, Alvor #2, Olhão e Tavira) do que nas estações de Olhão selecionados para o estudo de Cravo *et al.* (2012).

Um estudo sobre a atividade da AChE nas amêijoas em diversos pontos de um lago no norte da Tunísia, obteve variações médias entre 2,7 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}\text{prot}$ e 3,8 nmol min^{-1}

mg⁻¹prot. O ponto de amostragem onde se verificaram valores mais baixos de AChE corresponde a um local industrial, no qual são libertadas grandes quantidades de água residual não tratada. Os autores do estudo pensam que os xenobióticos libertados no lago, especialmente metais pesados e compostos organofosforados, possam provocar efeitos adversos nos organismos filtradores através da inibição da atividade enzimática (183). Ao comparar estes valores com os resultados obtidos, apenas as amêijoas de Tavira têm uma atividade enzimática superior (2,9 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot) ao valor mais baixo registado na Tunísia (2,7 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot).

Campillo *et al.* (2013) estudaram os potenciais efeitos que diversos contaminantes presentes nas águas poderiam exercer sobre as amêijoas. Foram selecionados quatro locais de amostragem no Mar Menor, Espanha, dos quais dois deles são considerados locais de referência ou controlo, uma vez que são locais que não são afetados pelo sistema de efluentes. A medição da atividade da AChE foi realizada em três períodos diferentes ao longo de 22 dias. Foram analisadas as concentrações dessa enzima nas brânquias que, por norma, é onde são encontrados os valores mais elevados desta enzima. Os valores médios de AChE obtidos variam entre 1,13 e 2,29 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot. Os valores mais elevados correspondiam aos locais controlo (265). Comparando com os resultados obtidos no nosso estudo (variações entre 1,5 e 2,9 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot), os valores são semelhantes aos obtidos nos locais controlo. Nas amêijoas de Olhão, obtiveram-se resultados mais baixos que nos restantes locais (Alvor #1, Alvor #2 e Tavira) que apresentaram valores acima dos 2,1 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot e mais próximos dos valores obtidos por Campillo *et al.* (2013) nos locais sujeitos a pressões antropogénicas e com maiores concentrações de contaminantes.

No entanto, a comparação entre os valores obtidos dos biomarcadores em diferentes organismos ou em tecidos ou órgãos, mesmo de indivíduos pertencendo à mesma espécie, é muito relativa. Bocquené *et al.* (1997) reforçou essa relatividade ao quantificar a atividade da AChE nos vários tecidos da ostra *Crassostrea gigas*. Os valores da atividade variaram entre 6 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot (músculo adutor liso) e 28 nmol min⁻¹ mg⁻¹prot (brânquias) (267). O resultado obtido em tecidos é sempre diferente quando se compara com o indivíduo inteiro. Também se sabe que, sob condições de baixa contaminação e/ou poluição, os fatores ambientais podem afetar as respostas dos biomarcadores em maior grau do que o *stress* associado a contaminantes (182). Dependendo da disponibilidade de

alimento, do estado reprodutivo, do crescimento (entre outros) e da concentração de contaminantes, as respostas dos biomarcadores podem variar temporalmente e essas alterações podem refletir apenas uma parte natural do ciclo fisiológico da espécie e não estarem diretamente relacionadas com a exposição a contaminantes (268). Portanto, para aplicar uma abordagem multibiomarcadores para avaliar os efeitos da contaminação e/ou poluição, a variabilidade natural dos biomarcadores deve ser estimada (269).

Recentemente, Trombini *et al.* (2019) avaliaram o impacto de alguns xenobióticos (carbamazepina, diclofenac e ibuprofeno) nas respostas de vários biomarcadores, incluindo a AChE. O estudo foi realizado em laboratório, na qual as amêijoas *Ruditapes philipinarum* foram expostas a uma determinada concentração de cada um dos xenobióticos e, posteriormente, foram quantificadas os biomarcadores nas brânquias e na glândula digestiva, durante um período de 24 dias. Os resultados obtidos para a atividade da AChE foram muito superiores aos registrados neste estudo, embora os tecidos utilizados sejam diferentes. No entanto, a curto prazo, houve um aumento da atividade da AChE na presença de cada um dos três xenobióticos testados nas brânquias, ou seja, houve uma ativação da atividade enzimática. Porém, ultrapassado o período de adaptação dos indivíduos expostos aos xenobióticos, os valores da AChE diminuíram novamente, exibindo valores muito próximos aos dos indivíduos controle. Logo, os efeitos neurotóxicos induzidos por estes xenobióticos, pelo menos nas concentrações testadas, demonstraram ser reversíveis (270).

Como referido anteriormente, os valores de cada biomarcador são variáveis não só consoante diferentes indivíduos da mesma espécie mas principalmente entre diferentes espécies. Especificamente acerca da AChE e relativamente aos moluscos bivalves, os estudos existentes de espécies de bivalves, com exceção da amêijoia *Ruditapes decussatus* e do mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, são escassos. Adicionalmente, os dados existentes e os estudos realizados até agora, na sua maioria, são executados apenas em tecidos específicos dos moluscos bivalves e não na totalidade do organismo, como foi o caso do nosso estudo. Consequentemente, a caracterização do estado fisiológico dos organismos analisados e a qualidade ambiental dos locais de amostragem ficam comprometidas por falta de informação para comparação.

7.2. Peroxidação lipídica (LPO)

A Figura 26 apresenta a quantificação da peroxidação lipídica nas diferentes espécies de moluscos bivalves e por local de amostragem.

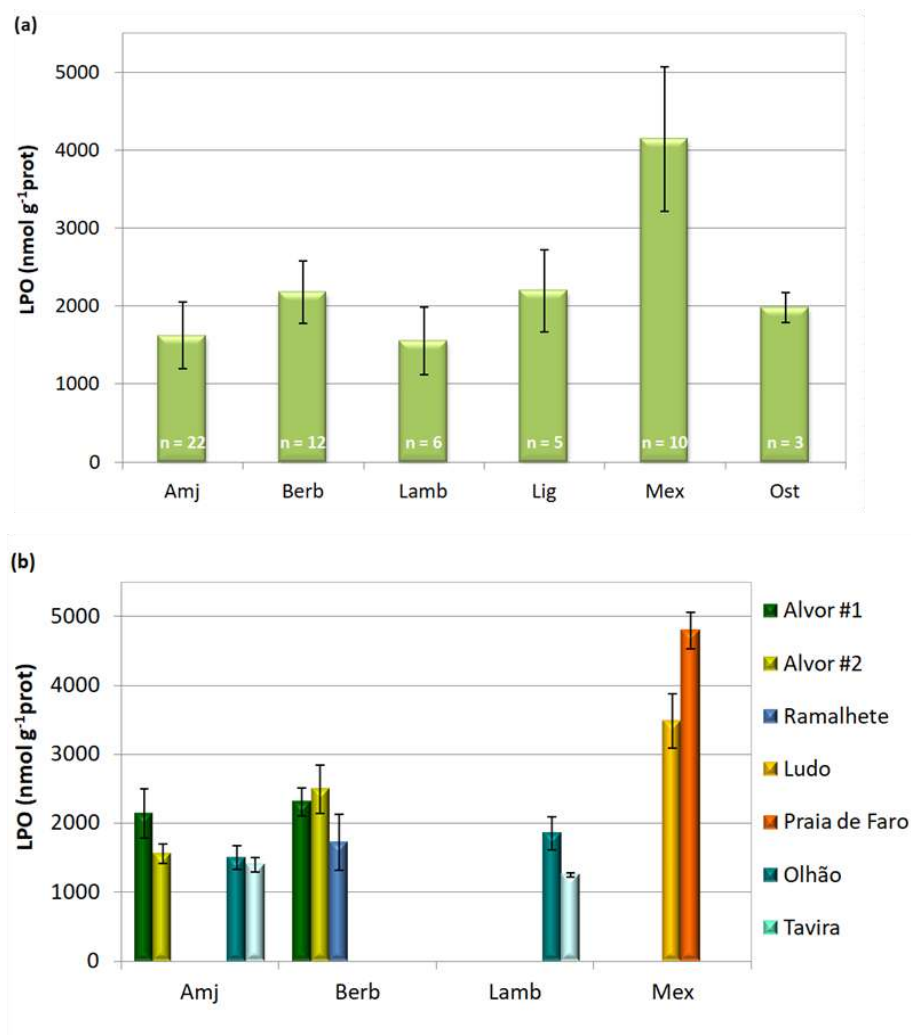


Figura 26: Peroxidação lipídica (LPO) por espécie (a) e por local de amostragem (b) dos moluscos bivalves em estudo.

A peroxidação lipídica acontece quando um organismo ativa um mecanismo de defesa contra a formação de ROS e consequentemente entra em *stress* oxidativo. Este mecanismo de defesa vai provocar danos graves nas membranas das moléculas e tecidos biológicos, nomeadamente, a oxidação dos ácidos gordos.

Das várias espécies de bivalves em estudo, as que apresentam maior grau de LPO é o mexilhão (4142 nmol g⁻¹prot), seguido, por ordem decrescente, do lingueirão (2194 nmol g⁻¹prot), do berbigão (2175 nmol g⁻¹prot), da ostra (1979 nmol g⁻¹prot), da amêijoia (1622

nmol g⁻¹prot) e da lambujinha (1553 nmol g⁻¹prot) (Figura 26 (a)). Os desvios padrão relativos são muito variáveis, desde 9,5% (ostra) a 27% (lambujinha).

Tal como acontece na AChE, cada espécie apresenta um valor de LPO próprio e diferente das restantes espécies. Contudo, exceto o mexilhão, não foram observadas diferenças significativas da peroxidação lipídica nas várias variedades de bivalves. Este facto poderá também ser associado aos diferentes hábitos alimentares, em que o mexilhão é a única espécie que é filtradora de água a nível da coluna de água, já que a ostra pode viver sobre caixas acima do sedimento e refletirá a qualidade da água já próxima do sedimento.

As amêijoas analisadas em quatro pontos de amostragem diferentes, não apresentaram diferenças significativas entre si em três dos locais analisados (Alvor #1, Alvor #2 e Tavira) ($p > 0,05$). Como se observa na Figura 26 (b), local onde os indivíduos apresentavam concentrações mais elevadas de LPO foi em Alvor #1 (2145 nmol g⁻¹prot), seguido de Alvor #2 (1562 nmol g⁻¹prot), Olhão (1502 nmol g⁻¹prot) e Tavira (1398 nmol g⁻¹prot).

Os berbigões também não apresentam diferenças estatisticamente significativas nos três locais de amostragem ($p > 0,05$). Os berbigões de Alvor #2 exibem maiores concentrações (2490 nmol g⁻¹prot), a seguir estão os indivíduos de Alvor #1 (2308 nmol g⁻¹prot) e Ramalhete (1726 nmol g⁻¹prot).

As lambujinhas não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os locais de Olhão (1856 nmol g⁻¹prot) e Tavira (1250 nmol g⁻¹prot) ($p > 0,05$).

Os dois locais de amostragem dos mexilhões, Ludo (3484 nmol g⁻¹prot) e Praia de Faro (4800 nmol g⁻¹prot), também não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$). Esta espécie apresentou os valores mais elevados entre as espécies em estudo, o que pode refletir um maior *stress* ambiental, não necessariamente associado ao local de amostragem, mas ao seu hábito alimentar, filtrador de água na coluna de água e, consequentemente, poderá ser mais sensível.

A correlação entre a cafeína e a LPO e entre o IC e o LPO não é significativa. Como já referido anteriormente, quanto menor a peroxidação lipídica, melhor é o estado fisiológico dos organismos. Se forem comparados os resultados obtidos da LPO com os

dos fármacos nos moluscos bivalves (Capítulo VI, Secção 6, Tabela 26), observa-se que o valor mais alto registado para a LPO (mexilhão) corresponde aos indivíduos com a concentração de cafeína mais baixa. Também no caso do lingueirão e da lambujinha, espécies das quais se registaram os valores mais elevados de cafeína, estão entre os valores mais baixos obtidos para a quantificação da LPO. Estes dados sugerem que a cafeína não está diretamente associada ao aumento do *stress* oxidativo destes organismos e que este *stress* é provocado por outros fatores que não a cafeína, podendo ser fatores bióticos ou abióticos.

Almeida *et al.* (2011) no seu estudo realizado com mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis*, quantificaram a peroxidação lipídica (LPO) destes organismos em vários locais do Algarve. Um dos locais analisados foi Faro que, por sua vez, também é o local de amostragem dos mexilhões deste estudo. Os autores associaram este biomarcador à concentração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's) de elevado peso molecular. Almeida *et al.* obtiveram valores médios de LPO de 1500 nmol g⁻¹prot e 1800 nmol g⁻¹prot no inverno e no verão respetivamente (245). Contrariamente ao que aconteceu com a AChE, foram registados valores de LPO significativamente mais elevados, com valores médios de 4142 nmol g⁻¹prot. No entanto, não se pode fazer uma comparação direta com estes dados uma vez que no estudo de Almeida *et al.* a LPO foi quantificada nas brânquias dos mexilhões enquanto neste estudo ocorreu quantificação da LPO no organismo total.

Concordantes com os resultados anteriores, o estudo realizado por Cravo *et al.* (2012) na Ria Formosa, Portugal, com amêijoas obtiveram valores médios de LPO no mês de Outubro entre 111 nmol g⁻¹prot e 293 nmol g⁻¹prot (237). Estes valores são muito inferiores aos obtidos no nosso estudo (1622 nmol g⁻¹prot). À semelhança do estudo anterior e da grande maioria dos ensaios que envolvem a quantificação da peroxidação lipídica, o local do organismo que foi analisado foram as brânquias e não o indivíduo na sua totalidade. Geret *et al.* (2003) também comparou os valores de LPO das brânquias e das glândulas digestivas em amêijoa-boia da Ria Formosa. Verificaram que os valores entre os dois tecidos eram muito diferentes. As glândulas digestivas, que segundo os autores são os órgãos onde se originam ou acumulam as espécies reativas de oxigénio (ROS), apresentam valores entre os 700 nmol g⁻¹prot e 1100 nmol g⁻¹prot, aproximadamente. Foram analisados quatro locais de amostragem, incluindo um

controlo, e apenas num local é que se observaram diferenças significativas com os restantes. Esse local, com valores de LPO mais elevados ($1100 \text{ nmol g}^{-1}\text{prot}$), foi caracterizado por exibir concentrações mais elevadas de metais pesados, PCB'S e PAH'S comparativamente com os restantes locais (244). Os resultados obtidos neste estudo rondam os $1622 \text{ nmol g}^{-1}\text{prot}$, para a amêijoia-boa. Entre os quatro locais analisados (Alvor #1, Alvor #2, Tavira e Olhão), Olhão apresentou valores mais baixos de LPO (aproximadamente $1500 \text{ nmol g}^{-1}\text{prot}$). No estudo de Geret *et al.* (2003), também Olhão apresentou os valores mais baixos de LPO, porém todos os valores obtidos nesse estudo encontram-se abaixo dos níveis determinados neste estudo. Mais uma vez, não é possível fazer uma comparação direta entre os valores deste biomarcador e as condições ambientais, dado que Geret *et al.* (2003) determinou a LPO nas brânquias e glândulas digestivas enquanto neste nosso estudo foi realizado na totalidade de indivíduo.

7.3. Sistema de transporte de eletrões (ETS)

A Figura 27 apresenta a atividade do sistema de transporte nas diferentes espécies de bivalves e por local de amostragem.

Através da medição do ETS é possível obter uma estimativa da fração utilizada pelo indivíduo para a respiração.

Como se observa na Figura 27 (a), a espécie com o valor de ETS mais elevado é o lingueirão ($44 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$), seguido do mexilhão ($41 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$), da ostra ($36 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$), da amêijoia-boa ($24 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$), da lambujinha ($17 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$) e do berbigão ($10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$). Os DPR foram baixos, com variações entre os 0,5% (mexilhão) e os 8% (amêijoia).

A ETS apresenta diferenças estatisticamente significativas entre as várias variedades de moluscos bivalves ($p < 0,05$). No entanto estas diferenças devem-se aos valores obtidos para o berbigão, o qual apresenta valores significativamente mais baixos ($10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$). Retirando o berbigão da análise dos dados, não há diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de ETS para as restantes espécies, com um valor médio de $32 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$.

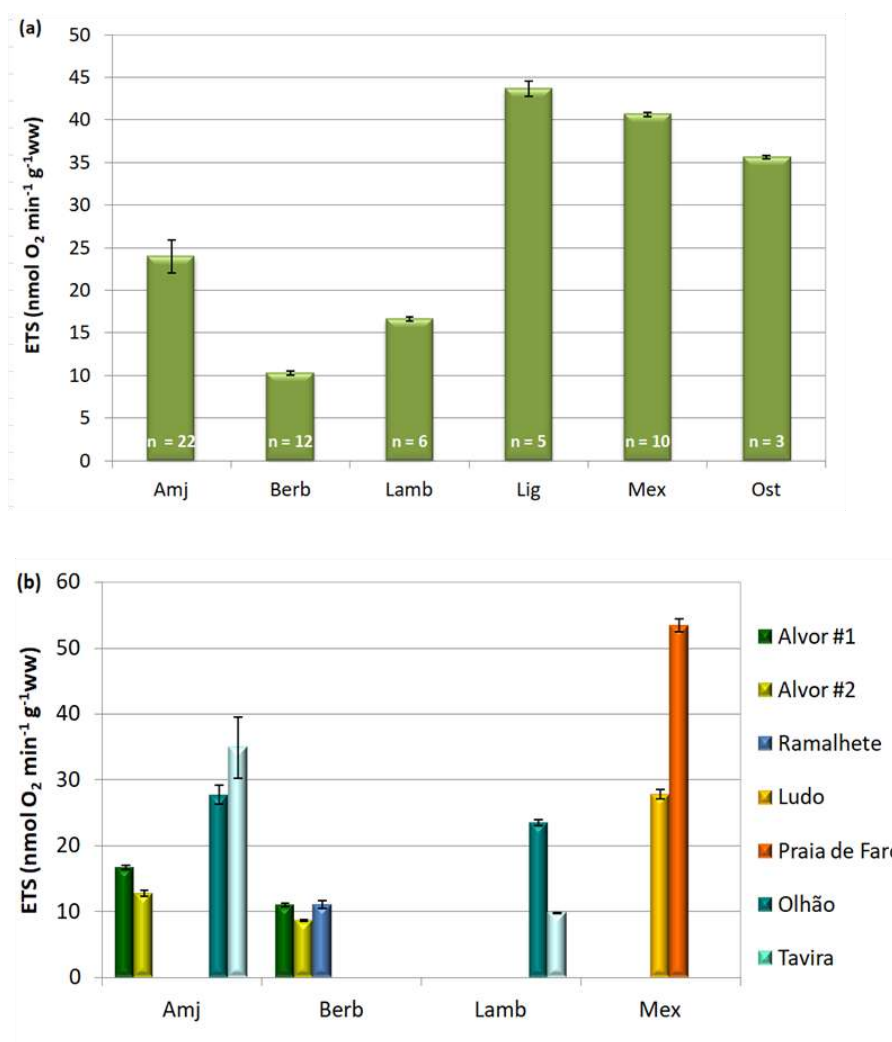


Figura 27: Atividade do sistema de transporte de eletrões (ETS) por espécie (a) e por local de amostragem (b) dos moluscos bivalves em estudo.

A amêijoia-boia apresentou diferenças significativas entre os locais de amostragem ($p < 0,05$). O valor mais baixo pertence às amêijoas do Alvor #2 ($13 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$), enquanto que não foram observadas diferenças entre Alvor #1 ($17 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$), Olhão ($33 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$) e Tavira ($35 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$) (Figura 27 (b)). Este facto pode sugerir que as amêijoas de Alvor estão sujeitas a menor *stress* ambiental, isto é, estão menos expostas a fatores (bióticos ou abióticos) que provocam alterações diretamente na atividade da ETS, comparativamente com os restantes locais.

A lambujinha também não apresentou diferenças significativas entre Olhão ($24 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$) e Tavira ($10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$).

Os três locais de amostragem dos berbigões não apresentaram diferenças significativas entre eles. Os valores médios obtidos foram de $11 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$ para o Alvor #1, $9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$ para Alvor #2 e $11 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$ para o Ramalhete.

Ainda assim, estes dados parecem sugerir que Alvor #2 poderá estar sujeito a uma ligeira diminuição de *stress* ambiental comparativamente aos outros locais de amostragem.

Os mexilhões do Ludo e da Praia de Faro tal como a lambujinha, também não diferiram significativamente com valores médios de $28 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$ e $53 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$, respetivamente.

Quanto maior for a ETS, maior a energia gasta na cadeia respiratória, o qual é indicativo de maior *stress* fisiológico dos organismos. Dentro de cada espécie há uma correlação positiva ($0,63 \text{ (amêijoas)} < r < 1,0 \text{ (mexilhão, lambujinha e berbigão)}$) entre a cafeína e a ETS. No global, esta correlação não é significativa ($r = 0.23$) possivelmente inerente à variedade intraespecífica.

Dentro de cada espécie há uma forte correlação entre o IC e a ETS. No entanto, esta correlação é negativa para as amêijoas ($r = -0,76$) e positiva para os restantes moluscos bivalves ($r = 1$).

Cruz *et al.* (2016) realizaram um ensaio com amêijoas de um canal da Ria de Aveiro, descrito como um local de baixa contaminação, no qual os organismos foram expostos a sucessivas e crescentes concentrações de cafeína e mediram a atividade da cadeia respiratória. Os indivíduos controlo, depurados durante 96 horas sob condições ótimas e controladas para a limpeza de contaminantes e sedimentos dos seus tecidos, apresentaram níveis de ETS de cerca de $10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$. Nos indivíduos sujeitos a exposições de $18 \text{ } \mu\text{g/L}$ de cafeína registou-se valores de $12 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{ww}$ (7). Os resultados da medição da atividade da ETS na amêijoas-boa da Ria Formosa foram muito superiores aos descritos por Cruz *et al.* (2016), determinados pelo mesmo método e expressos nas mesmas unidades. Como já referido, quanto maior é a atividade da cadeia respiratória de um organismo comparativamente a um valor de referência de um organismos da mesma espécie, maior é o *stress* a que o individuo está sujeito, com um decaimento no seu estado fisiológico. Assim, os dados parecem indicar que as amêijoas analisadas neste estudo estão sob maior *stress*, não necessariamente devido à presença de elevadas concentrações de cafeína mas devido a outros xenobióticos e/ou algum fator ambiental, biótico ou abiótico.

Os estudos acerca deste biomarcador ainda são mais escassos do que os estudos acerca da LPO e da AChE. Ainda são muito poucos os investigadores que utilizam o

sistema de transporte de eletrões como um biomarcador para avaliar o estado fisiológico dos organismos, em particular dos bivalves. Consequentemente, é difícil encontrar dados para comparar com os resultados obtidos, dado que os estudos em moluscos bivalves são escassos e a maioria dos estudos que existem sobre moluscos bivalves centram-se nas espécies de amêijoas e mexilhões. Não foram encontrados dados das medições de ETS de outras espécies de bivalves.

É de salientar que as lambujinhas e os mexilhões não apresentaram diferenças significativas para os três biomarcadores (AChE, LPO, ETS) nos locais analisados, sugerindo que as zonas de amostragem apresentam condições de exposição semelhantes, embora nas lambujinhas tenham sido registadas temperaturas diferentes no dia da amostragem (Tavira = 16 °C e Olhão = 19 °C).

O IC das lambujinhas e dos mexilhões confirma os resultados demonstrados pelos biomarcadores, nos quais os organismos apresentam condições fisiológicas intraespecíficas semelhantes.

Efetivamente é difícil correlacionar todos os fatores que podem alterar os biomarcadores nas várias espécies de moluscos, por avaliação individual de cada biomarcador com o(s) potencial(ais) fator(es) de contaminação, em simultâneo com a alteração dos parâmetros nutricionais, os quais, também eles, podem ser uma consequência dessas mesmas alterações.

Por esse motivo, procedeu-se a uma análise multivariada através da análise de componentes principais (PCA). Nas Figuras 28(a) e 29(a) mostra-se a associação entre as variáveis enquanto nas Figuras 28(b) e 29(b), a projeção dos locais com base nas mesmas variáveis. Esta análise ajuda também na compreensão das correlações entre as variáveis para os vários locais de amostragem bem como a associação/semelhanças entre os mesmos. As Figuras 28 e 29 apresentam esta análise por PCA. Os 3 principais fatores da análise PCA explicam praticamente 93% da variância dos resultados para as espécies e variáveis em causa. O PC1, o principal fator que explica 40,8% da variância (Figura 28 (a)), mostra claramente a separação das amêijoas dos vários locais (Alvor #1 e #2, Olhão e Tavira) e mexilhões do Ludo com um comportamento semelhante entre si em oposição ao comportamento das ostras de Tavira e lingueirão de Alvor#2 (onde ocorreram as maiores concentrações de cafeína, os bivalves registaram as maiores dimensões e massa

edível, proteínas e AChE). O PC2 que explica 34,4% da variância, mostra o carácter distinto entre as ostras (com maior massa total e matéria gorda) e os lingueirões (com maiores IC, hidratos de carbono, cafeína e ETS). Por fim o PC3 explica 17,6 % da variância e mostra o comportamento oposto das amêijoas e ostras de Tavira (onde se registaram os maiores valores de pH e oxigénio dissolvido) do dos mexilhões do Ludo, que registaram os maiores valores de LPO associado a maiores teores de cinza, salinidades e menores valores de oxigénio dissolvido e pH.

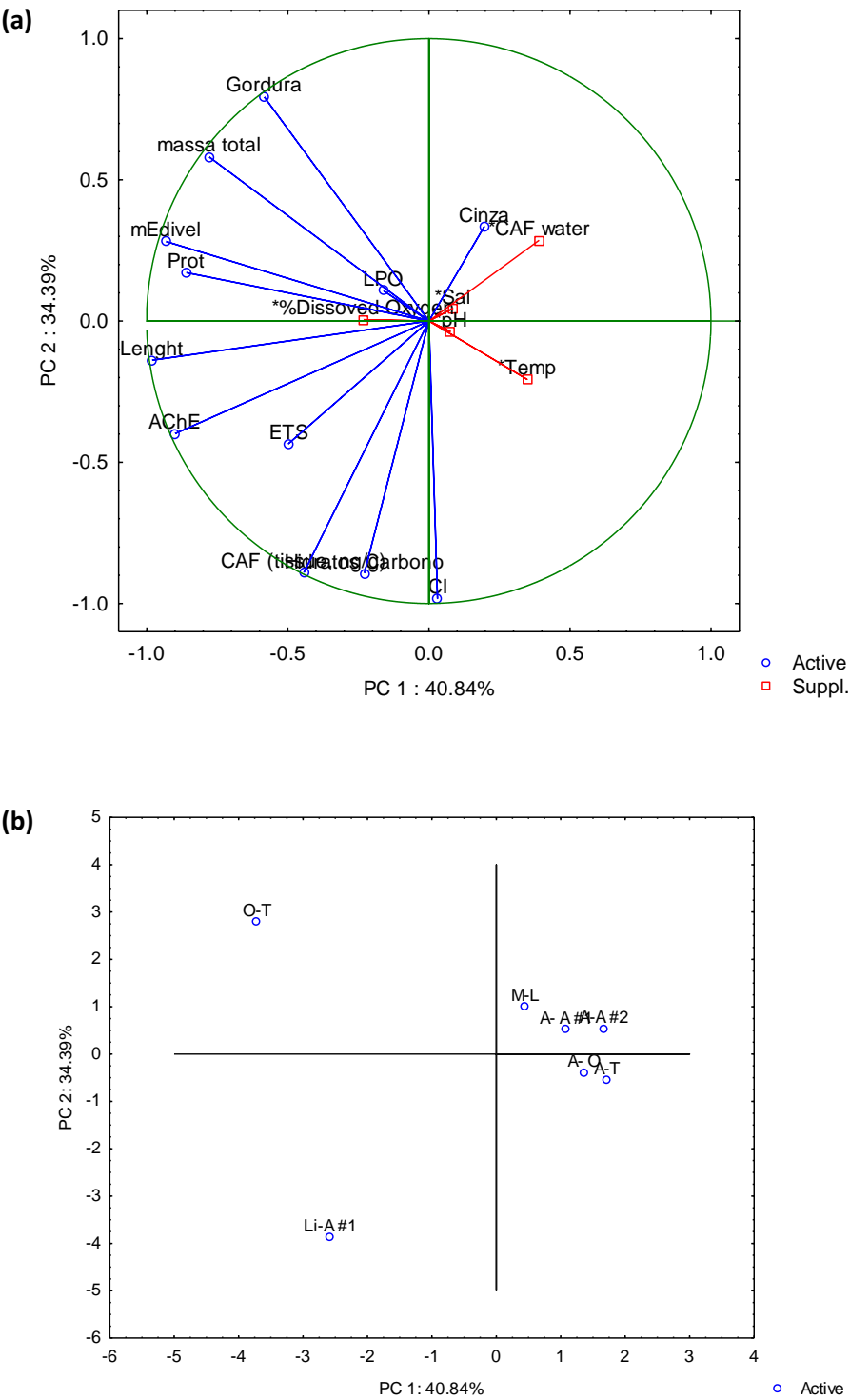


Figura 28: Análise de componentes principais (PCA), PC1 vs PC2.

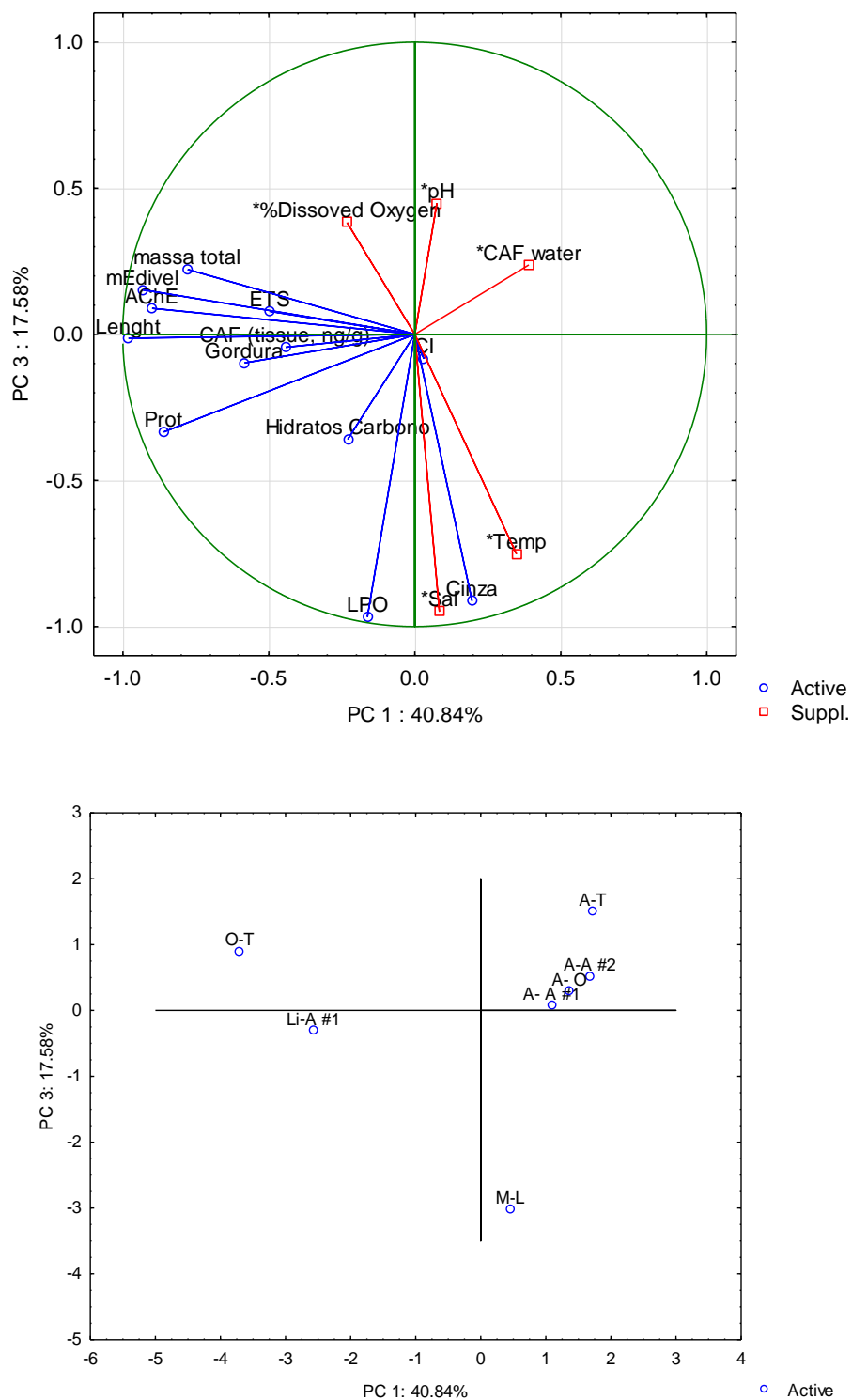


Figura 29: Análise de componentes principais (PCA), PC1 vs PC3.

É importante referir que os níveis de cafeína quer nas águas marinhas, quer bioacumulados nos bivalves se podem considerar relativamente baixas e como tal a respostas dos biomarcadores, que não são específicos para a cafeína, podem estar a responder quer à variabilidade natural dos fatores ambientais, como a fatores bióticos próprios de cada espécie. Na natureza os xenobióticos não ocorrem isolados mas sim em misturas por vezes complexas, como que em "cocktail" e, como tal, a presença simultânea de vários contaminantes podem mascarar parte da resposta dos três biomarcadores selecionados. Por outro lado, os níveis da cafeína podem ser suficientemente baixos para que a resposta dos biomarcadores não seja evidente. Contudo, a atividade mais elevada de AChE em indivíduos maiores pode resultar da sua atividade ser proporcional às suas dimensões. Porém, não parece que os níveis de concentração de cafeína estejam a inibir de forma global os bivalves, apesar de, para a lambujinha e o berbigão, tal se tenha registado. Contudo, no meio recetor podem existir outros xenobióticos que têm a capacidade de induzir a AChE (270). Em relação à atividade da ETS também se verificou que os indivíduos maiores e com maiores concentrações de cafeína, apresentaram maior atividade da ETS, o que pode sugerir que estes indivíduos estão sob maior *stress* fisiológico. O LPO teve um papel terciário na explicação da variância dos resultados, o que pode sugerir que a peroxidação lipídica não é um fator de dano muito acentuado para os bivalves analisados nos locais de amostragem. É de referir que nenhum dos locais de amostragem teve como critério de seleção a forte contribuição de fonte antropogénica. Adicionalmente também se pretendeu analisar várias espécies dos mesmos locais para se avaliar a variabilidade interespecífica.

Capítulo VII- Conclusões e perspectivas futuras

1. Conclusões

O método de HPLC-UV validado permite a quantificação da cafeína a partir de 0,5 mg/L. O método apresenta três gamas de trabalho: gama baixa (GB) - 0,5 mg/L a 2,4 mg/L; gama intermédia (GIm) - 4 mg/L a 20 mg/L e gama alta (GA) - 23 mg/L a 60 mg/L. Este método é preciso com desvios-padrão relativos inferiores a 6% em condições de repetibilidade.

O método de QuEChERS-HPLC-UV apresenta um limite de deteção e de quantificação de 0,15 mg/L e 0,5 mg/L de cafeína. No molusco bivalve e para uma massa de 1 g, o LD e LQ são de 0,36 µg/g e 1,2 µg/g, respetivamente. Este método apresenta uma forte interferência de matriz na análise dos moluscos, com recuperações inferiores a 30%. A utilização de um padrão interno de concentração ou surrogate (hidroximetilfurfural) ultrapassou esta limitação, obtendo-se recuperações na ordem dos 80%.

Pelo método de QuEChERS-HPLC-UV não foi detetada cafeína em nenhuma das amostras analisadas. A análise por QuEChERS-HPLC-MS/MS detetou cafeína na maioria das amostras de moluscos bivalves (82 % de amostras positivas), no entanto só algumas amostras apresentaram valores acima do MQL (33%).

Da análise por HPLC-MS/MS para despiste da cafeína e de outros fármacos (24 compostos) nas águas marinhas, conclui-se que a cafeína é o único composto presente em todas as amostras (100% positivos), com concentrações entre os 18 ng/L (Alvor #1) e os 83 ng/L (Olhão). As amostras também apresentaram paracetamol (43% amostras positivas), naproxeno (14% amostras positivas) e testosterona (14% amostras positivas).

A concentração de cafeína nas amostras positivas de bivalves variou entre 0,27 ng/g (mexilhão/Ludo) e 5,7 ng/g (lingueirão/Alvor #1). A variação de concentração da cafeína entre os vários moluscos foi a seguinte: amêijoia-bola, 0,58 ng/g (Olhão) a 0,98 ng/g (Tavira); berbigão, 0,65 ng/g (Alvor #2) a 1,6 ng/g (Ramalhete); lambujinha, 1,2 ng/g (Tavira) a 1,7 ng/g (Olhão); lingueirão, 5,7 ng/g; e mexilhão, 0,27 ng/g (Ludo) a 0,69 ng/g (Praia de Faro).

A concentração de cafeína reflete a sua bioacumulação nos tecidos dos bivalves ao longo da sua vida, enquanto na água reflete apenas as condições de dispersão e solubilidade no momento da amostragem.

Neste estudo pretendeu-se avaliar a variabilidade inter e intra-específica em espécies de bivalves provenientes de 2 sistemas lagunares distintos na costa sul de Portugal- Ria de Alvor e Ria Formosa. As várias espécies, recolhidas em várias estações de amostragem são típicas e dominantes nestes ecossistemas e representam também várias estratégias alimentares. Os vários locais de amostragem dos moluscos bivalves, apesar de aparentemente não sofrerem fortes contaminações antropogénicas também apresentaram diferentes condições ambientais medidas *in situ*, particularmente mais evidente a nível da variabilidade do oxigénio.

Globalmente, para as diferentes espécies, o índice de condição (IC) variou entre 18% (ostra) e 68% (lingueirão), a ostra apresentou a maior razão casca/edível em oposição ao lingueirão (menor razão casca/edível), com variações de IC para a mesma espécie em função do local de amostragem.

As amêijoas de Alvor #1 registaram valores mais elevados de massa total, massa da casca e massa edível, comprimento, largura e espessura, comparativamente às de Alvor #2, Olhão e Tavira, enquanto a razão casca/edível foi menor nas amêijoas de Olhão. Os berbigões do Ramalhete apresentaram os valores das medições morfométricas e do IC (34%) mais elevados, o que sugere que os indivíduos do Ramalhete estavam sujeitos a menor *stress* ambiental. O IC e a razão casca/edível das lambujinhas e dos mexilhões podem sugerir que estes moluscos estavam expostos a condições bióticas e/ou abióticas semelhantes.

Todas as espécies de moluscos bivalves apresentaram teores de humidade e de cinza semelhantes, com variações entre os 80 % (berbigão) e os 87% (amêijoa-boa) e entre os 3% (lingueirão) e 4% (mexilhão), respetivamente. O teor em proteína variou muito entre as espécies, com valores entre 6,4% (berbigão) e 11% (ostra). O teor em matéria gorda variou entre 0,6% (lingueirão) e 2,1% (ostra). Os hidratos de carbono variaram entre os 0,6% (ostra) e 3,2% (lingueirão).

A comparação entre o IC e a cafeína nos moluscos bivalves, sugere que a concentração de cafeína nas águas marinhas, isoladamente, não é um fator determinante no *stress* e consequentemente no estado fisiológico das espécies de bivalves estudadas.

Dentro do grupo das amêijoas onde também se incluem as lambujinhas, estas são detritívoras ao contrário das amêijoas-boas que são filtradoras. As concentrações mais elevadas de cafeína encontradas nos tecidos das lambujinhas podem sugerir que a bioacessibilidade da cafeína nos sedimentos é maior que na coluna de água.

Da análise dos três biomarcadores de efeito, nomeadamente, a acetilcolinesterase (AChE), a peroxidação lipídica (LPO) e o sistema de transporte de eletrões (ETS), as principais conclusões são:

- As espécies onde foram registadas a maior e a menor atividade da AChE foram o lingueirão (Alvor #1) e a amêijoas-boas (Olhão) respetivamente. A correlação entre a cafeína e a acetilcolinesterase não sugere que este contaminante, pelo menos nas concentrações encontradas, influencie diretamente a inibição/indução da atividade da AChE.
- As espécies onde foram registadas a maior e a menor LPO foram o mexilhão (Praia de Faro) e a lambujinha (Tavira), respetivamente. Dentro do grupo das amêijoas, a LPO foi mais baixa em Olhão, o que pode sugerir que, neste local, as amêijoas estão sujeitas a menos compostos que causam peroxidação lipídica. Entre as várias espécies em estudo, o mexilhão registou valores excecionalmente altos de LPO comparativamente com as restantes espécies. Estes valores podem ser indicativos de um maior *stress* destes organismos associado ao seu hábito alimentar (filtrador na coluna de água). A correlação entre a LPO e a cafeína sugere que esta não está diretamente associada ao aumento do dano e *stress* oxidativo dos organismos e que esse *stress* deve ser provocado por outros fatores, bióticos ou abióticos.
- As espécies onde foram registadas maior e menor atividade da ETS foram o lingueirão (Alvor #1) e o berbigão (Ramalhete), respetivamente. Para as amêijoas-boas, as de Alvor registaram valores inferiores aos da Ria Formosa, o que pode refletir que nestes dois locais da Ria de Alvor as amêijoas estão sujeitas a menor grau de *stress* ambiental do que na Ria Formosa. Os dados obtidos tanto para os berbigões como para as lambujinhas e os mexilhões sugerem que estas espécies responderam de forma semelhante a nível da ETS, a fatores de *stress* que provocam o *stress* oxidativo dos organismos. Também se verificou que os indivíduos maiores e com maiores concentrações de cafeína, também apresentaram maiores valores da ETS, o que pode sugerir que estes indivíduos estavam sob *stress* fisiológico. Além das suas grandes dimensões, o lingueirão vive

enterrado verticalmente no sedimento, o qual pode acumular outros contaminantes e consequentemente aumentar a atividade da ETS destes bivalves.

- Os maiores valores de AChE, LPO e ETS foram registados na amêijoia-boia de Olhão, mexilhão da Praia de Faro e lingueirão de Alvor #1, respetivamente.
- A espécie que apresentou a maior amplitude de valores para os três biomarcadores e consequentemente pareceu refletir melhor o *stress* ambiental foi o mexilhão, com os valores mais elevados de LPO e a ETS e dos menores valores de AChE.

Este estudo ajudou a compreender a diversidade de respostas dentro da mesma comunidade e mesmo em indivíduos da mesma espécie. Há um amplo espectro de fatores que podem influenciar essas respostas, quer fatores naturais e cíclicos, próprias do ambiente, do clima e da fisiologia dos organismos, até alterações não naturais, como o caso da contaminação do ambiente marinho. Estudou-se apenas a cafeína no ambiente marinho, mas provavelmente existem outros compostos que podem ser bioacumulados e estar a condicionar a resposta dos biomarcadores selecionados, que não são específicos para a cafeína. Por outro lado, os níveis de contaminação podem ser relativamente baixos e as respostas dos biomarcadores podem refletir a variabilidade natural dos mesmos em que a interação de vários fatores naturais e cíclicos, próprios do ambiente, pode sobrepor-se aos causados pela presença dos contaminantes.

A correlação entre os dados ambientais (naturais ou contaminação marinha) com os vários parâmetros dos moluscos bivalves (morfométricos, nutricionais e bioquímicos) foram uma boa ferramenta de trabalho para uma melhor compreensão do impacto dos vários fatores nas condições fisiológicas destes moluscos.

2. Perspetivas futuras

É necessário compreender melhor os processos bioquímicos associados às variações dos biomarcadores, as interações entre os vários fatores que provocam o *stress* nos moluscos, os potenciais efeitos que derivam dessas interações, como a sinergia, a adição ou o antagonismo, e de que modo estes podem influenciar as variações dos biomarcadores. Adicionalmente, também é crucial estimar a variabilidade natural dos biomarcadores, associada a variáveis bióticas, assim como identificar os valores de referência para cada espécie de bivalves, isto é, o intervalo considerado típico para a

variação de cada biomarcador em condições naturais e não stressantes. Para além disso, e para facilitar a compreensão e comparação entre estudos, seria vantajoso uniformizar não só o método de análise (fator que pode determinar resultados díspares), mas particularmente, o tecido mais apropriado para determinar a atividade de cada biomarcador de efeito, que, como reforçado no decorrer deste estudo, pode variar bastante consoante o tecido ou a utilização integral do indivíduo em análise.

Para outro trabalho futuro, seria interessante analisar outros contaminantes e uma bateria de outros biomarcadores e, se possível, mais específicos, onde se possa estabelecer relação causa-efeito.

Referências bibliográficas

1. Aguirre-Martínez G V., DelValls AT, Martín-Díaz ML. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;120:142–54.
2. Aguirre-Martínez G V., Buratti S, Fabbri E, DelValls AT, Martín-Díaz ML. Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. *J Environ Sci.* 2013;25(7):1408–18.
3. Alvarez-Muñoz D, Huerta B, Fernandez-Tejedor M, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D. Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. *Talanta.* 2015;136:174–82.
4. Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ.* 2000;247:295–311.
5. Capolupo M, Valbonesi P, Kiwan A, Buratti S, Franzellitti S, Fabbri E. Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Sci Total Environ.* 2016;563–564:538–48.
6. Dafouz R, Cáceres N, Rodríguez-Gil JL, Mastroianni N, López de Alda M, Barceló D, et al. Does the presence of caffeine in the marine environment represent an environmental risk? A regional and global study. *Sci Total Environ.* 2018;615:632–42.
7. Cruz D, Almeida Â, Calisto V, Esteves VI, Schneider RJ, Wrona FJ, et al. Caffeine impacts in the clam *Ruditapes philippinarum*: Alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. *Chemosphere.* 2016;160:95–103.
8. Drug Bank. Caffeine. 2005 [cited 2019 Jul 24]. Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00201>
9. National Center for Biotechnology Information. Caffeine. PubChem Compound Database; CID=2519 [cited 2019 Jul 24]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine#section=Top>
10. Bermejo DV, Luna P, Manic MS, Najdanovic-Visak V, Reglero G, Fornari T. Extraction of caffeine from natural matter using a bio-renewable agrochemical solvent. *Food Bioprod Process.* 2013;91:303–9.
11. Luiz AL, Maciel EVS, Lanças FM. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. *Sci Chromatogr.* 2015;7(3):157–82.
12. Shehata AB, Rizk MS, Rend EA. Certification of caffeine reference material purity by ultraviolet/visible spectrophotometry and high-performance liquid chromatography with diode-array detection as two independent analytical methods. *J food drug Anal.* 2016;24:703–15.
13. Oliveira M. Moluscos bivalves em Portugal: composição química e metais contaminantes. Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2012. Available from:

<http://run.unl.pt/handle/10362/8466>

14. Coutinho ÂMS. Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da ostra do Sado. Tese de Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria; 2012. Available from: <https://dev4.rcaap.pt/jspui/handle/10400.8/744?mode=simple>
15. Espinosa-Pérez JD, Vargas A, Robles-Olvera VJ, Rodríguez-Jimenes GC, García-Alvarado MA. Mathematical modeling of caffeine kinetic during solid-liquid extraction of coffee beans. *J Food Eng.* 2007;81:72–8.
16. Cerqueira MBR, Guilherme JR, Caldas SS, Martins ML, Zanella R, Primel EG. Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. *Chemosphere.* 2014;107:74–82.
17. Silva CGA, Collins CH. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Quim Nova.* 2011;34(4):665–76.
18. Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Solé M, Porte C, Cajaraville MP. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat Toxicol.* 2002;58:75–98.
19. Bebianno MJ, G  ret F, Hoarau P, Serafim MA, Coelho MR, Gnassia-Barelli M, et al. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers.* 2004;9(4–5):305–30.
20. Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarker S. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology.* 2006;15:333–40.
21. Gagn   F, Blaise C, Fournier M, Hansen PD. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp Biochem Physiol.* 2006;143:179–86.
22. Fauconneau B. Health value and safety quality of aquaculture products. *Rev M  decine V  t  rinaire.* 2002;153(5):331–6.
23. Hui YH, Cross N, Kristinsson HG, Lim MH, Nip W., Siow LF, et al. Food Biochemistry and Food Processing. In: Hui YH, Nip W-K, Nollet LML, Paliyath G, Simpson BK, editors. *Food Biochemistry and Food Processing*. Blackwell Publishing; 2006. p. 351–78.
24. Food and Agriculture Organization-FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2012. 1–209 p.
25. Comiss  o de Coordena  o e Desenvolvimento Regional do Algarve. Guia metodol  gico de Delimita  o e Altera  o da Delimita  o da Reserva Ecol  gica Nacional (REN) [cited 2019 May 28]. Available from: <https://www.ccdr-alg.pt/site/info/guia-metodologico>
26. Anacleto P, Maulvault AL, Nunes ML, Carvalho ML, Rosa R, Marques A. Effects of depuration on metal levels and health status of bivalve molluscs. *Food Control.* 2015;47:493–501.
27. Verdelhos T, Marques JC, Anast  cio P. The impact of estuarine salinity changes on the bivalves *Scrobicularia plana* and *Cerastoderma edule*, illustrated by behavioral and mortality responses on a laboratory assay. *Ecol Indic.* 2015;52:96–104.

28. Martins RG do R. Caracterização temporal e espacial da pradaria marinha na ria de Alvor (Portugal) aplicando sistemas de informação geográfica. Tese de Mestrado em Biologia Marinha, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve; 2014. Available from: <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/7044>
29. Instituto Nacional de Estatística, Direção-Geral de Recursos Naturais Segurança e Serviços Marítimos. Estatísticas da Pesca. 2017.
30. Rolo VLM da S. Intervenção no sapal oeste da vila de Alvor: um exemplo de recuperação?. Tese de Mestrado em Biologia e Geologia, especialização em Educação, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve; 2007. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.1/486>
31. Campos CJA, Cachola RA. Faecal coliforms in bivalve harvesting areas of the alvor lagoon (Southern Portugal): Influence of seasonal variability and urban development. *Environ Monit Assess*. 2007;133:31–41.
32. Mateus M, Almeida D, Simonson W, Felgueiras M, Banza P, Batty L. Conflicting uses of coastal areas: A case study in a southern European coastal lagoon (Ria de Alvor, Portugal). *Ocean Coast Manag*. 2016;132:90–100.
33. Ribeiras do Algarve. Plano de Gestão de Região Hidrográfica (Parte 2). Região Hidrográfica Das Ribeiras Do Algarve. Agência Portuguesa do Ambiente. 2016;
34. Lopes AAP. Infra-estruturas de apoio, parque agro-patrimonial da Ria de Alvor: Centro de interpretação e conservação de património rural e albergue de juventude. Tese de Mestrado em Arquitetura, Instituto Superior Manuel Teixeira Gomes; 2014. Available from: <http://hdl.handle.net/10437/9207>
35. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). Convenção de Ramsar- Zonas Húmidas. [cited 2019 Mar 15]. Available from: <http://www2.icnf.pt/portal/pn/biodiversidade/ei/ramsar>
36. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). Parque Natural da Ria Formosa. Geologia, Hidrologia, Clima. [cited 2019 Jun 28]. Available from: <http://www.icnf.pt/portal/ap/p-nat/pnln/geo>
37. Caetano MJM. Biogeoquímica do manganês, ferro, cobre e cádmio em sedimentos da ria formosa. Tese de Doutoramento em Ciências do Mar, especialização em Química Marinha, Universidade do Algarve; 1998. Available from: <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/5270>
38. Ceia FR dos S. Vulnerabilidade das ilhas-barreira e dinâmica da Ria Formosa na óptica da gestão. Tese de Mestrado em Gestão e Conservação da Natureza, Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve; 2007. Available from: <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/671>
39. Marcelo MJ, Fonseca LC da. Ria Formosa: da gestão e conservação de uma área protegida. *Rev Biol*. 1998;16(1–4):125–33.
40. Matias D, Joaquim S, Matias AM, Moura P, de Sousa JT, Sobral P, et al. The reproductive cycle of the European clam *Ruditapes decussatus* (L., 1758) in two Portuguese populations: Implications for management and aquaculture programs. *Aquaculture*. 2013;406–407:52–61.
41. Plomaritis TA, Costas S, Ferreira Ó. Use of a Bayesian Network for coastal hazards, impact

- and disaster risk reduction assessment at a coastal barrier (Ria Formosa, Portugal). *Coast Eng.* 2018;134:134–47.
42. Costa JC, Lousã M, Espírito-Santo MD. A Vegetação do Parque Natural da Ria Formosa (Algarve, Portugal). *Stud Bot.* 1996;15:69–157.
 43. Albino CIC. Sistemas urbanos de drenagem de águas residuais e pluviais. Contributo para a análise da problemática de interferência dos dois tipos de sistemas- caso de estudo: cidade de Olhão. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente, Universidade do Algarve; 2013. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.1/6659>
 44. Plano Setorial da Rede Natura 2000. Zonas de Proteção Especial (ZPE). Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (ICNB); 1999.
 45. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). Parque Natural da Ria Formosa. Classificação, Caracterização. [cited 2019 May 28]. Available from: <http://www2.icnf.pt/portal/ap/p-nat/pnrf/class-carac>
 46. Cunha V de A. Redução do teor de contaminantes químicos em bivalves provenientes do estuário do Tejo. Tese de mestrado em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa; 2012. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.5/5326>
 47. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The state of world fisheries and aquaculture. 2016.
 48. Anacleto P, Barrento S, Nunes ML, Rosa R, Marques A. Portuguese consumers' attitudes and perceptions of bivalve molluscs. *Food Control.* 2014;41:168–77.
 49. Pinto ASM. *Listeria monocytogenes* em moluscos bivalves vivos: ocorrência e avaliação do crescimento a diferentes temperaturas de refrigeração. Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2011. Available from: <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/4807?locale=en>
 50. Instituto Português do Mar e da Atmosfera. Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos Bivalves (SNMB). 2013. p. 16.
 51. Cabral ML. Avaliação da contaminação microbiológica e da resposta ao stress ambiental em moluscos bivalves da Ria Formosa. Tese de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Instituto Superior de Engenharia da Universidade do Algarve; 2015. Available from: <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/7689>
 52. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Regulamento (CE) N.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. Jornal Oficial da União Europeia 2004 p. 83–127.
 53. Monteiro LM. Estudo da eficácia da depuração na redução da contaminação bacteriológica do mexilhão (*Mytilus spp.*) e a sua viabilidade. Tese de Mestrado em Saúde Pública, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2004. Available from: <http://hdl.handle.net/10216/9777>
 54. Bernardino FN V. Review of aquaculture development in Portugal. *J Appl Ichthyol.* 2000;16:196–9.
 55. Lopes da Silva DA. Caracterização nutricional da ameijola (*Callista chione*): influência da época de captura e do processamento. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar, Qualidade e Segurança Alimentar, Instituto Superior de Agronomia da Uiversidade de

- Lisboa; 2017. Available from: <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/15114>
56. Dias MF. Qualidade sensorial de peixes de aquacultura vs peixes capturados no mar. Tese de Mestrado em Qualidade Alimentar em Restauração, Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril; 2012. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.26/4414>
 57. Almeida C, Karadzic V, Vaz S. The seafood market in Portugal: Driving forces and consequences. *Mar Policy*. 2015;61:87–94.
 58. Comissão da Comunidades Europeias. Regulamento (CE) n^o 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006. Jornal Oficial da União Europeia 2006 p. 5–24.
 59. Almeida C, Soares F. Microbiological monitoring of bivalves from the Ria Formosa Lagoon (south coast of Portugal): A 20 years of sanitary survey. *Mar Pollut Bull*. 2012;64:252–62.
 60. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Diretiva 2006/113/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Dezembro de 2006. Jornal Oficial da União Europeia. 2006. p. 14–20.
 61. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Directiva 2004/41/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Abril de 2004. Jornal Oficial da União Europeia. 2004. p. 12–5.
 62. Amaral ACZ, Rizzo AE, Arruda EP. Manual de identificação dos invertebrados marinhos da Região Sudeste-Sul do Brasil: Volume 1. Edusp; 2006. 288 p.
 63. López C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A. Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J Invertebr Pathol*. 1997;69(1):51–7.
 64. Aladaileh S, Nair S V., Birch D, Raftos DA. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function. *J Invertebr Pathol*. 2007;96:48–63.
 65. Pimentel RJ. Bivalvia (Mollusca) do Pliocénico de Vale de Freixo (Pombal). Tese de mestrado em Paleontologia, Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2018. Available from: <http://hdl.handle.net/10362/45944>
 66. Thorp JH, Covich AP. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (3rd Ed). 2009.
 67. Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA). Morfologia, biologia e ecologia dos moluscos bivalves. [cited 2019 Aug 28]. Available from: <http://www.ipma.pt/pt/enciclopedia/pescas/index.html>
 68. Dumbauld BR, Ruesink JL, Rumrill SS. The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. *Aquaculture*. 2009;290:196–223.
 69. Aranda-Burgos JA, Da Costa F, Nóvoa S, Ojea J, Martínez-Patiño D. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture*. 2014;420–421:38–48.
 70. da Costa F, Nóvoa S, Ojea J, Martínez-Patiño D. Changes in biochemical and fatty acid composition of the razor clam *Solen marginatus* (Solenidae: Bivalvia) during larval development. *Mar Biol*. 2011;158:1829–40.
 71. Gaspar MJB. Bivalves do litoral pceânico algarvio. Aspetos da biologia, ecologia e da pescaria do mananciais de interesse económico: aplicação à gestão dos recursos. Tese de

- Doutoramento em Ciências do Mar, especialidade Ciências e Tecnologias das Pescas, Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos da Universidade do Algarve.; 1996. Available from: <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/7501>
72. Lucas A, Beninger PG. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*. 1985;44:187–200.
 73. Norkko J, Pilditch CA, Thrush SF, Wells RMG. Effects of food availability and hypoxia on bivalves: The value of using multiple parameters to measure bivalve condition in environmental studies. *Mar Ecol Prog Ser*. 2005;298:205–18.
 74. Filgueira R, Comeau LA, Landry T, Grant J, Guyondet T, Mallet A. Bivalve condition index as an indicator of aquaculture intensity: A meta-analysis. *Ecol Indic*. 2013;25:215–29.
 75. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). [cited 2019 Jun 10]. Available from: <https://itis.gov/>
 76. As espécies mais populares do mar de Portugal: Num restaurante perto de si. Ciência Viva- Agência Nacional para a Cultura Científica e Tecnológica. 2014 [cited 2019 May 8]. Available from: http://www.cienciaviva.pt/flipbooks/Catalogo_Especies_do_MAR_de_Portugal/#p=4
 77. Marques HSA. Composição nutricional e risco toxicológico do pescado consumido em Portugal. Artigo Científico de Revisão Sistemática Final, Licenciatura em Ciências da Nutrição, Universidade New Atlântica; 2015. Available from: <http://hdl.handle.net/10884/990>
 78. Mota FC. Estudo da deterioração da amêijoia-boia *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758). Tese de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade do Algarve; 2013. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.1/3462>
 79. Camacho AP, Delgado M, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U. Energy balance, gonad development and biochemical composition in the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar Ecol Prog Ser*. 2003;258:133–45.
 80. Albentosa M, Fernández-Reiriz MJ, Labarta U, Pérez-Camacho A. Response of two species of clams, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis pullastra*, to starvation: Physiological and biochemical parameters. *Comp Biochem Physiol Part B*. 2007;146:241–9.
 81. De Montaudouin X, Bachelet G, Sauriau PG. Secondary settlement of cockles *Cerastoderma edule* as a function of current velocity and substratum: A flume study with benthic juveniles. *Hydrobiologia*. 2003;503:103–16.
 82. Crespo D, Verdelhos T, Dolbeth M, Pardal MÂ. Effects of the over harvesting on an edible cockle (*Cerastoderma edule* Linnaeus , 1758) population on a Southern European estuary. *Fresenius Environ Bull*. 2010;19:2801–11.
 83. Nilin J, Pestana JLT, Ferreira NG, Loureiro S, Costa-Lotufo LV, Soares AMVM. Physiological responses of the European cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia : Cardidae) as indicators of coastal lagoon pollution. *Sci Total Environ*. 2012;435–436:44–52.
 84. Krakau M, Jacobsen S, Jensen KT, Reise K. The cockle *Cerastoderma edule* at Northeast Atlantic shores: Genetic signatures of glacial refugia. *Mar Biol*. 2012;159:221–30.
 85. Parada JM, Molares J. Natural mortality of the cockle *Cerastoderma edule* (L.) from the Ria of Arousa (NW Spain) intertidal zone. *Rev Biol Mar y Oceanogr*. 2008;43(3):501–11.

86. Casagrande C, Boudouresque CF. Abundance, population structure and production of *Scrobicularia plana* and *Abra tenuis* (Bivalvia: Scrobicularidae) in a mediterranean brackish lagoon, Lake Ichkeul, Tunisia. *Int Rev Hydrobiol*. 2005;90(4):376–91.
87. Santos SA. Patterns of distribution , dynamics and genetic variation in the peppery furrow shell *Scrobicularia plana*. Tese de Doutorado em Matemática e Ciências Naturais, Universidade de Groningen; 2012. Available from: <http://hdl.handle.net/11370/0711dbce-8bbd-49db-a77d-cf8f8a8c696d>
88. Bryan GW, Uysal H. Heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* from the tamar estuary in relation to environmental levels. *J Mar Biol Assoc United Kingdom*. 1978;58:89–108.
89. Anastácio PM, Verdelhos T, Marques JC, Pardal MA. A validated population-dynamics model for *Scrobicularia plana* (Mollusca, Bivalvia) in a south-western European estuary. *Mar Freshw Res*. 2009;60:404–16.
90. Verdelhos T, Cardoso PG, Dolbeth M, Pardal MA. Latitudinal gradients in *Scrobicularia plana* reproduction patterns, population dynamics, growth, and secondary production. *Mar Ecol Prog Ser*. 2011;442:271–83.
91. Hughes RN. An Energy Budget for a Tidal-Flat Population of the Bivalve *Scrobicularia plana* (Da Costa). *J Anim Ecol*. 1970;39:357–81.
92. Boldina-Cosqueric I, Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Dedourge-Geffard O, Métais I, Mouneyrac C, et al. Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2010;73:1733–41.
93. Da Costa F, Nóvoa S, Ojea J, Martínez-Patiño D. Effects of algal diets and starvation on growth, survival and fatty acid composition of *Solen marginatus* (Bivalvia: Solenidae) larvae. *Sci Mar*. 2012;76(3):527–37.
94. Fernández-Tajes J, González-Tizón A, Martínez-Lage A, Méndez J. Cytogenetics of the razor clam *Solen marginatus* (Mollusca: Bivalvia: Solenidae). *Cytogenet Genome Res*. 2003;101(1):43–6.
95. Remacha-Trivino A, Anadón N. Reproductive cycle of the razor clam *Solen marginatus* (Pulteney 1799) in Spain: a comparative study in three different locations. *J Shellfish Res*. 2006;25:869–76.
96. González F da C. Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (E. siliqua Linneo, 1758) y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennánt, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvários. Tese de Doutorado em Biologia, Universidade de Santiago de Compostela; 2009. Available from: <http://hdl.handle.net/10347/2539>
97. da Costa F, Martínez-Patiño D. Culture potential of the razor clam *Solen marginatus* (Pennánt, 1777). *Aquaculture*. 2009;288:57–64.
98. Maia F, Sobral MP, Gaspar M. Ciclo reprodutivo e primeira maturação de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ria de Aveiro. Bases científicas para a gestão destes recursos. Relatórios científicos e técnicos IPIMAR, Série Digit. 2006;30:35.
99. Slabyj BM, Creamer DL, True RH. Seasonal effect on yield , proximate composition , and quality of blue mussel , *Mytilus edulis* , meats obtained from cultivated and natural stock.

Mar Fish Rev. 1978;40:18–23.

100. Braby CE, Somero GN. Ecological gradients and relative abundance of native (*Mytilus trossulus*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) blue mussels in the California hybrid zone. *Mar Biol.* 2005;148(6):1249–62.
101. Zardi GI, Nicastro KR, McQuaid CD, Rius M, Porri F. Hydrodynamic stress and habitat partitioning between indigenous (*Perna perna*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) mussels: Constraints of an evolutionary strategy. *Mar Biol.* 2006;150:79–88.
102. Stankovic S, Jovic M. Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood. *Environ Chem Lett.* 2012;10:119–30.
103. Carrington E. Seasonal variation in the attachment strength of blue mussels: Causes and consequences. *Limnol Oceanogr.* 2002;47(6):1723–33.
104. Fearman J-A, Bolch CJS, Moltschaniwskyj NA. Energy Storage and Reproduction in Mussels, *Mytilus galloprovincialis*: The Influence of Diet Quality . *J Shellfish Res.* 2009;28(2):305–12.
105. O'Connor NE, Crowe TP. Biodiversity among mussels: separating the influence of sizes of mussels from the ages of patches. *J Mar Biol Assoc United Kingdom.* 2007;87:551–7.
106. Portela TPM. Distribuição e recrutamento da ostra-portuguesa, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), no estuário do Sado. Tese de Mestrado em Ecologia Marinha, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.; 2016. Available from: <http://hdl.handle.net/10451/27466>
107. Dijkema R. Fisheries and farming of important marine bivalves in Portugal. In: The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of north and central America and Europe, Volume 3. NOAA Technical Report NMFS; 1997.
108. World Register of Marine Species. [cited 2019 May 10]. Available from: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140656>
109. Cabello AM, Lezama R del VV, García B, Marcano M, Figueroa Y, González V. Parâmetros de Frescura de Moluscos. *Rev Cient.* 2004;
110. Deslous-Paoli J-M, Héral M. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat Living Resour.* 1988;1:239–49.
111. Resgalla-Jr. C, Brasil ES. Efeito da concentração e da qualidade do alimento nas taxas fisiológicas do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Atlântica.* 2007;29(1):47–59.
112. Takagi T, Itabashi Y, Kaneniwa M. Fatty Acid Composition of Bivalves from Japanese Waters. *J Japan Oil Chem Soc.* 1986;35(7):517–21.
113. Afonso CIM. Produtos da pesca capturados na costa portuguesa: benefícios e perigos associados ao seu consumo. Tese de Doutoramento em Farmácia, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2009. Available from: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/268/1/17702_Doutoramento_Claudia_Afonso.pdf
114. Oliveira VGP de. Segurança sanitária dos moluscos bivalves vivos produzidos em zonas estuarinas portuguesas e respetivo controlo oficial. Tese de Mestrado em Segurança Alimentar, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa; 2018. Available

from: <http://hdl.handle.net/10216/9777>

115. Burri S, Vale P. Contaminação de bivalves por DSP: risco de episódios de gastroenterites numa região de toxicidade endémica. *Rev Port Saúde Pública*. 2006;24(1):115–24.
116. Anacleto P, Pedro S, Nunes ML, Rosa R, Marques A. Microbiological composition of native and exotic clams from Tagus estuary: Effect of season and environmental parameters. *Mar Pollut Bull*. 2013;74:116–24.
117. Espana MSA, Rodríguez EMR, Romero CD. Comparison of mineral and trace element concentrations in two molluscs from the Strait of Magellan (Chile). *J Food Compos Anal*. 2007;20:273–9.
118. Vernocchi P, Maffei M, Lanciotti R, Suzzi G, Gardini F. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). *Food Control*. 2007;18:1575–83.
119. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Tabela de Composição de Alimentos. 2015 [cited 2019 May 10]. Available from: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/category?subcatId=27>
120. Buerge IJ, Poiger T, Müller MD, Buser H-R. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ Sci Technol*. 2003;37:691–700.
121. Teh SJ, Adams SM, Hinton DE. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat Toxicol*. 1997;37:51–70.
122. World Health Organization. Biomarkers and risk assessment: Concepts and principles. Environmental Health Criteria. 1993. 3–82 p.
123. Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA. Biomarkers as tools to assess sediment quality. Laboratory and field surveys. *Trends Anal Chem*. 2004;23(10–11):807–18.
124. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2003;13:57–149.
125. Aguirre-Martínez G V., DelValls TA, Martín-Díaz ML. General stress, detoxification pathways, neurotoxicity and genotoxicity evaluated in *Ruditapes philippinarum* exposed to human pharmaceuticals. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016;124:18–31.
126. Van Gestel CAM, Van Brummelen TC. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. 1996;5:217–25.
127. Gagné F, André C, Gélinas M. Neurochemical effects of benzodiazepine and morphine on freshwater mussels. *Comp Biochem Physiol Part C*. 2010;152:207–14.
128. Yoon Y, Ryu J, Oh J, Choi BG, Snyder SA. Occurrence of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products in the Han River (Seoul, South Korea). *Sci Total Environ*. 2010;408:636–43.
129. Linhares DPS, Garcia PV, Amaral L, Ferreira T, Cury JA, Vieira W, et al. Sensitivity of two biomarkers for biomonitoring exposure to fluoride in children and women: A study in a volcanic area. *Chemosphere*. 2016;155:614–20.
130. Fraker SL, Smith GR. Direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* tadpoles. *Environ Toxicol*. 2004;19:250–6.

131. Silkworth JB, Brown Jr JF. Evaluating the impact of exposure to environmental contaminants on human health. *Clin Chem*. 1996;42(8(B)):1345–9.
132. Verenitch SS, Lowe CJ, Mazumder A. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1116:193–203.
133. Comeau F, Surette C, Brun GL, Losier R. The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Sci Total Environ*. 2008;396:132–46.
134. Freitas R, Almeida Â, Pires A, Velez C, Calisto V, Schneider RJ, et al. The effects of carbamazepine on macroinvertebrate species: Comparing bivalves and polychaetes biochemical responses. *Water Res*. 2015;85:137–47.
135. Almeida Â, Calisto V, Esteves VI, Schneider RJ, Soares AMVM, Figueira E, et al. Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: Effects on bivalves. *Aquat Toxicol*. 2014;156:74–87.
136. Álvarez-Muñoz D, Rodríguez-Mozaz S, Maulvault AL, Tediosi A, Fernández-Tejedor M, Van den Heuvel F, et al. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environ Res*. 2015;143:56–64.
137. Dodder NG, Maruya KA, Ferguson PL, Grace R, Klosterhaus S, La Guardia M, et al. Occurrence of contaminants of emerging concern in mussels (*Mytilus spp.*) along the California coast and the influence of land use, stormwater discharge, and treated wastewater effluent. *Mar Pollut Bull*. 2013;81(2):340–6.
138. Petrović M, Gonzalez S, Barceló D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends Anal Chem*. 2003;22(10):685–96.
139. Kummerer K. Pharmaceuticals in the Environment. *Annu Rev Environ Resour*. 2010;35:57–75.
140. Gaffney V, Cardoso V, Benoliel MJ, Almeida C. Contaminantes emergentes - fármacos: monitorização, avaliação do risco ambiental e do risco para a saúde humana. *Águas e Resíduos*, IV. 2016;(1):15–27.
141. Gaffney V. Monitorização de fármacos na água bruta e na água para consumo humano por cromatografia líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massa tandem. Tese de Doutoramento em Farmácia, Especialidade em Bromatologia. Universidade de Lisboa; 2014. Available from: <http://hdl.handle.net/10451/15651>
142. Sauvé S, Desrosiers M. A review of what is an emerging contaminant. *Sauvé Desrosiers Chem Cent J*. 2014;8:8–15.
143. Rodrigues J, Albino S, Silva S, Cravo A, Cardoso VV, Benoliel MJ, et al. Development of a multiresidue method for the determination of 24 pharmaceuticals in clams by QuEChERS and liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods*. 2019;12:838–51.
144. Almeida Â, Freitas R, Calisto V, Esteves VI, Schneider RJ, Soares AMVM, et al. Chronic toxicity of the antiepileptic carbamazepine on the clam *Ruditapes philippinarum*. *Comp Biochem Physiol Part C*. 2015;172–173:26–35.
145. Aguirre-Martínez G V., DelValls AT, Laura Martín-Díaz M. Yes, caffeine, ibuprofen,

- carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;120:142–54.
146. Antunes SC, Freitas R, Figueira E, Gonçalves F, Nunes B. Biochemical effects of acetaminophen in aquatic species: Edible clams *Venerupis decussata* and *Venerupis philippinarum*. *Environ Sci Pollut Res.* 2013;20:6658–66.
147. Ismail NS, Müller CE, Morgan RR, Luthy RG. Uptake of contaminants of emerging concern by the bivalves *anodonta californiensis* and *corbicula fluminea*. *Environ Sci Technol.* 2014;48(16):9211–9.
148. De Maria CAB, Moreira RFA. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. *Quim Nova.* 2007;30(1):99–105.
149. Bhawani SA, Fong SS, Ibrahim NM. Spectrophotometric Analysis of Caffeine. *Int J Anal Chem.* 2015;2015:1–7.
150. Pires A, Almeida A, Correia J, Calisto V, Schneider RJ, Esteves VI, et al. Long-term exposure to caffeine and carbamazepine: Impacts on the regenerative capacity of the polychaete *Diopatra neapolitana*. *Chemosphere.* 2016;146:565–73.
151. Shehata AB, Rizk MS, Rend EA. Certification of caffeine reference material purity by ultraviolet/visible spectrophotometry and high-performance liquid chromatography with diode-array detection as two independent analytical methods. *J Food Drug Anal.* 2016;24:703–15.
152. Santos-Silva TG, Montagner CC, Martinez CBR. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018;58:237–42.
153. Stamatis NK, Konstantinou IK. Occurrence and removal of emerging pharmaceutical, personal care compounds and caffeine tracer in municipal sewage treatment plant in Western Greece. *J Environ Sci Heal - Part B, Pestic Food Contam Agric Wastes.* 2013;48(9):800–13.
154. Sadeu JC, Hughes CL, Agarwal S, Foster WG. Alcohol, drugs, caffeine, tobacco, and environmental contaminant exposure: Reproductive health consequences and clinical implications. *Crit Rev Toxicol.* 2010;40(7):633–52.
155. Jeanneau L, Solecki O, Wéry N, Jardé E, Gourmelon M, Communal P, et al. Relative decay of fecal indicator bacteria and human-associated markers: A microcosm study simulating wastewater input into seawater and freshwater. *Environ Sci Technol.* 2012;46:2375–82.
156. Siegener R, Chen RF. Caffeine in Boston Harbor seawater. *Mar Pollut Bull.* 2002;44:383–7.
157. Drug Bank [cited 2019 May 14]. 2005.
158. Weimann A, Sabroe M, Poulsen HE. Measurement of caffeine and five of the major metabolites in urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2005;40:307–16.
159. Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, Asproдини E. In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomed Chromatogr.* 2007;21:190–200.
160. Burg AW, Werner E. Tissue distribution of caffeine and its metabolites in the mouse. *Biochem Pharmacol.* 1972;21:923–36.

161. Eteng M, Eyong E, Akpanyung E, Agiang M, Aremu C. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant Foods Hum Nutr.* 1997;51:231–43.
162. Senta I, Gracia-Lor E, Borsotti A, Zuccato E, Castiglioni S. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water Res.* 2015;74:23–33.
163. Rodriguez del Rey Z, Granek EF, Sylvester S. Occurrence and concentration of caffeine in Oregon coastal waters. *Mar Pollut Bull.* 2012;64:1417–24.
164. Moore MT, Greenway SL, Farris JL, Guerra B. Assessing caffeine as an emerging environmental concern using conventional approaches. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2008;54:31–5.
165. Gaffney V, Cardoso VV, Cardoso E, Teixeira AP, Martins J, Benoliel MJ, et al. Occurrence and behaviour of pharmaceutical compounds in a Portuguese wastewater treatment plant: Removal efficiency through conventional treatment processes. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24:14717–34.
166. Rodriguez del Rey Z, Granek EF, Buckley BA. Expression of HSP70 in *Mytilus californianus* following exposure to caffeine. *Ecotoxicology.* 2011;20:855–61.
167. Banerjee P, Ali Z, Levine B, Fowler DR. Fatal caffeine intoxication: A series of eight cases from 1999 to 2009. *J Forensic Sci.* 2014;59(3):865–8.
168. Comissão Europeia. Regulamento (UE) N° 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009. Jornal Oficial da União Europeia 2009 p. 11–36.
169. Cheney RH. The effects of caffeine on oxygen consumption and cell division in the fertilized egg of the sea urchin, *Arbacia punctulata*. *J Gen Physiol.* 1945;29(2):63–72.
170. Nath J, Rebhun LI. Effects of caffeine and other methylxanthines on the development and metabolism of sea Urchin eggs. *J Cell Biol.* 1976;68:440–50.
171. Sawyer SJ, Muscatine L. Cellular mechanisms underlying temperature-induced bleaching in the tropical sea anemone *Aiptasia pulchella*. *J Exp Biol.* 2001;204:3443–56.
172. Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Pascariello MF, Marinosci L, Schettino T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar Pollut Bull.* 2003;46:324–30.
173. Araújo CRM, Santos VL dos A, Gonsalves AA. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Rev Virtual Quim.* 2016;8(6):1818–34.
174. Mota WM, Barros ML, Cunha PEL, Santana MVA, Stevam CS, Leopoldo PTG. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. *Rev Bras Plantas Med.* 2012;14(4):624–8.
175. Matozzo V, Tomei A, Marin MG. Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Mar Pollut Bull.* 2005;50:1686–93.
176. Tsuchiya K, Yamamuro Y, Sensui N. Influence of estrogen on acetylcholinesterase activity in primary cultures of cerebral cells from neonatal rats. *Anim Sci J.* 2004;75:53–8.
177. Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future

- perspectives. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1–8.
178. Lopes FRAS. Análise temporal da resposta de biomarcadores bioquímicos e do nível de metais trações na ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*, (Guilding, 1828) cultivadas no complexo estuarino de laguna, SC. Tese de mestrado em aquicultura, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina; 2002. Available from: <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/83351>
179. Robillard S, Beauchamp G, Laulier M. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comp Biochem Physiol - Part C*. 2003;135:49–59.
180. Corsi I, Pastore AM, Lodde A, Palmerini E, Castagnolo L, Focardi S. Potential role of cholinesterases in the invasive capacity of the freshwater bivalve, *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionacea): A comparative study with the indigenous species of the genus, *Anodonta* sp. *Comp Biochem Physiol Part C*. 2007;145:413–9.
181. Rickwood CJ, Galloway TS. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect: A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquat Toxicol*. 2004;67:45–56.
182. Leiniö S, Lehtonen KK. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comp Biochem Physiol - Part C*. 2005;140:408–21.
183. Dellali M, Barelli MG, Romeo M, Aissa P. The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comp Biochem Physiol - Part C*. 2001;130:227–35.
184. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302–10.
185. Vasconcelos T, Cardoso ARNR, Josino JB, Macena RHM, Bastos VPD. Radicais livres e antioxidantes: Proteção ou perigo? *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. 2014;16(3):213–9.
186. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem*. 1995;41(12):1819–28.
187. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation : its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993;57(715–725).
188. Trevisan R. Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses. Projeto de licenciatura, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina; 2008. Available from: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/132883>
189. Zanette J, Monserrat JM, Bianchini A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comp Biochem Physiol Part C*. 2006;143:187–95.
190. Marnett LJ. Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. 1999;424:83–95.
191. Trevors JT. The measurement of electron transport system (ETS) activity in freshwater sediment. *Water Res*. 1984;18(5):581–4.
192. King FD, Packard TT. Respiration and the activity of the respiratory electron transport

- system in marine zooplankton. *Limnol Oceanogr.* 1975;20(5):849–54.
193. Pereira, Cristina, Souza AO de, Pazin M, Dorta DJ. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. *Rev Bras Toxicol.* 2012;25(1–2):1–14.
 194. Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Cadeia Respiratória Mitochondrial: Aspestos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. *Arq Medicina.* 2008;22(2/3):49–56.
 195. De Coen WM, Janssen CR. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J Aquat Ecosyst Stress Recover.* 1997;6:43–55.
 196. Båmstedt U. ETS activity as an estimator of respiratory rate of zooplankton populations. The significance of variations in environmental factors. *J Exp Mar Bio Ecol.* 1980;42:267–83.
 197. Linder M, Ackman RG. Volatile compounds recovered by Solid-Phase Microextraction from fresh adductor muscle and total lipids of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) from Georges Bank (Nova Scotia). *J Food Sci.* 2002;67:2032–7.
 198. Wen Y, Wang Y, Feng Y. Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta.* 2006;70(1):153–9.
 199. Pfannkoch EA, Stuff JR, Whitecavage JA, Blevins JM, Seely KA, Moran JH. A high throughput method for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood using QuEChERS extraction and SBSE. *Int J Anal Chem.* 2015;2015:1–8.
 200. Shrivastava K, Wu H-F. Ultrasonication followed by single-drop microextraction combined with GC/MS for rapid determination of organochlorine pesticides from fish. *J Sep Sci.* 2008;31(2):380–6.
 201. Sun X, Zhu F, Xi J, Lu T, Liu H, Tong Y, et al. Hollow fiber liquid-phase microextraction as clean-up step for the determination of organophosphorus pesticides residues in fish tissue by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Mar Pollut Bull.* 2011;63(5–12):102–7.
 202. Giger W. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393:37–44.
 203. Kumar A, Malik AK, Tewary DK, Singh B. Gradient HPLC of antibiotics in urine, ground water, chicken muscle, hospital wastewater, and pharmaceutical samples using C-18 and RP-amide columns. *J Sep Sci.* 2008;31:294–300.
 204. Aguilar-Arteaga K, Rodriguez JA, Miranda JM, Medina J, Barrado E. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion–HPLC. *Talanta.* 2010;80(3):1152–7.
 205. Ferreira AP. Cafeína como indicador ambiental prospectivo para avaliar ecossistemas aquáticos urbanos. *Cad Saude Publica.* 2005;21(6):1884–92.
 206. Goto T, Yoshida Y, Kiso M, Nagashima H. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *J Chromatogr A.* 1996;749:295–9.
 207. de Almeida Azevedo D, Lacorte S, Vinhas T, Viana P, Barceló D. Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas

- chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2000;879(1):13–26.
208. AOAC 1945. Official and tentative methods of analysis, Association of Official Agricultural Chemists. 6th ed. Pennsylvania;
209. AOAC 1947. Association of Official Agricultural Chemists. Association of Official Agricultural Chemists, editor.
210. Ishler NH, Finucane TP, Borker E. Rapid spectrophotometric determination of caffeine. *Anal Chem*. 1948;20(12):1162–6.
211. Newton JM. AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 1979.
212. Strahl NR, Lewis H, Fargen R. Comparison of gas chromatographic and spectrophotometric methods of determination for caffeine in coffees and teas. *J Agric Food Chem*. 1977;25(2):233–5.
213. Jimidar M, Hamoir TP, Foriers A, Massart DL. Comparison of capillary zone electrophoresis with high-performance liquid chromatography for the determination of additives in foodstuffs. *J Chromatogr*. 1993;636(1):179–86.
214. Dinç E, Baleanu D. Two new spectrophotometric approaches to the multicomponent analysis of the acetaminophen and caffeine in tablets by classical least-squares and principal component regression techniques. *Farmaco*. 2002;57(1):33–7.
215. Ohnsmann J, Quintás G, Garrigues S, de la Guardia M. Determination of caffeine in tea samples by Fourier transform infrared spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2002;374(3):561–5.
216. Pizzariello A, Švorc J, Stred'ansky M, Miertuš S. A biosensing method for detection of caffeine in coffee. *J Sci Food Agric*. 1999;79:1136–40.
217. Perrone D, Donangelo CM, Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chem*. 2008;110:1030–5.
218. Seiler RL, Zaugg SD, Thomas JM, Howcroft DL. Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. *Ground Water*. 1999;37(3):405–10.
219. Sanson AL. Estudo da extração e desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea de microcontaminantes orgânicos em água superficial por GC-MS e métodos quimiométricos. Tese de Mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto; 2012.
220. De Camargo MCR, Toledo MCF. HPLC determination of caffeine in tea, chocolate products and carbonated beverages. *J Sci Food Agric*. 1999;79:1861–4.
221. Conte ED, Barry EF, Rubinstein H. Determination of Caffeine in Beverages by Capillary Zone Electrophoresis: An Experiment for the Undergraduate Analytical Laboratory. *J Chem Educ*. 1996;73(12):1169.
222. Aranda M, Morlock G. Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1131(1–2):253–60.
223. Reto M, Figueira ME, Filipe HM, Almeida CMM. Chemical composition of green tea

- (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. *Plant Foods Hum Nutr.* 2007;62:139–44.
224. Gaffney V de J, Cardoso VV, Rodrigues A, Ferreira E, Benoliel MJ, Almeida CMM. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. *Quim Nova.* 2014;37(1):138–49.
 225. Da Silva DML, De Camargo PB, Martinelli LA, Lanças FM, Pinto JSS, Avelar WEP. Organochlorine pesticides in Piracicaba River basin (São Paulo/Brazil): a survey of sediment, bivalve and fish. *Quim Nova.* 2008;31(2):214–9.
 226. Cueva-Mestanza R, Torres-Padrón M., Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez J. Microwave-assisted micellar extraction coupled with solid-phase extraction for preconcentration of pharmaceuticals in molluscs prior to determination by HPLC. *Biomed Chromatogr.* 2008;22:1115–22.
 227. McEneff G, Barron L, Kelleher B, Paull B, Quinn B. A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. *Sci Total Environ.* 2014;476–477:317–26.
 228. Núñez M, Borrull F, Fontanals N, Pocurull E. Determination of pharmaceuticals in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407:3841–9.
 229. Dallarés S, Carrasco N, Álvarez-Muñoz D, Rambla-Alegre M, Solé M. Multibiomarker biomonitoring approach using three bivalve species in the Ebro Delta (Catalonia, Spain). *Environ Sci Pollut Res.* 2018;25(36):36745–58.
 230. Oliver LM, Fisher WS. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. *Biomarkers.* 1999;4(6):510–30.
 231. Mora P, Michel X, Narbonne J-F. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1999;7:253–60.
 232. Le Bris H, Maffart P, Bocquené G, Buchet V, Galgani F, Blanc G. Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial bivalves. *Aquaculture.* 1995;138:139–44.
 233. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
 234. Galgani F, Bocquene G. A method for routine detection of organophosphates and carbamates in sea water. *Environ Technol Lett.* 1989;10:311–22.
 235. Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere.* 2006;62:510–9.
 236. Amanullah B, Stalin A, Prabu P, Dhanapal S. Analysis of AChE and LDH in mollusc, *Lamellidens marginalis* after exposure to chlorpyrifos. *J Environ Biol.* 2010;31:417–9.
 237. Cravo A, Pereira C, Gomes T, Cardoso C, Serafim A, Almeida C, et al. A multibiomarker approach in the clam *Ruditapes decussatus* to assess the impact of pollution in the Ria Formosa lagoon, South Coast of Portugal. *Mar Environ Res.* 2012;23–34.
 238. Cravo A, Lopes B, Serafim Â, Company R, Barreira L, Gomes T, et al. A multibiomarker approach in *Mytilus galloprovincialis* to assess environmental quality. *J Environ Monit.* 2009;11:1673–86.
 239. Souza PR de. Caracterização da acetilcolinesterase das brânquias e trato digestório da

- ostra *Crassostrea rhizophorae* do estuário Canal de Santa Cruz , PE-Brasil. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas. Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco; 2016. Available from: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/25614>
240. Gutteridge J, Halliwell B. The measurement and mechanisms of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990;15:129–35.
 241. Frankel EN, Neff WE. Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim Biophys Acta.* 1983;754:264–70.
 242. Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone D. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp Biochem Physiol.* 1991;100C(1–2):187–90.
 243. Labrot F, Ribera D, Saint Denis M, Narbonne JF. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers.* 1996;1:21–8.
 244. Geret F, Serafim A, Bebianno MJ. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicology.* 2003;12:417–26.
 245. Almeida C, Pereira C, Gomes T, Bebianno MJ, Cravo A. DNA damage as a biomarker of genotoxic contamination in *Mytilus galloprovincialis* from the south coast of Portugal. *J Environ Monit.* 2011;13:2559–67.
 246. Ahmad I, Mohmood I, Mieiro CL, Coelho JP, Pacheco M, Santos MA, et al. Lipid peroxidation vs. antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury-Organ specificities and age effect. *Aquat Toxicol.* 2011;103:150–8.
 247. Maki JS, Remsen CC. Comparison of two direct-count methods for determining metabolizing bacteria in freshwater. *Appl Environ Microbiol.* 1981;41(5):1132–8.
 248. Peele ER, Colwell RR. Application of a direct microscopic method for enumeration of substrate-responsive marine bacteria. *Can J Microbiol.* 1981;27:1071–5.
 249. Cammen L, Corwin S, Christensen J. Electron transport system (ETS) activity as a measure of benthic macrofaunal metabolism. *Mar Ecol Prog Ser.* 1990;65:171–82.
 250. Madon SP, Schneider DW, Stoeckel JA. In situ estimation of zebra mussel metabolic rates using the electron transport system (ETS) assay. *J Shellfish Res.* 1998;17(1):195–203.
 251. Fanslow DL, Nalepa TF, Johengen TH. Seasonal changes in the respiratory electron transport system (ETS) and respiration of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in Saginaw Bay, Lake Huron. *Hydrobiologia.* 2001;448:61–70.
 252. Simčič T, Brancelj A. Respiratory electron transport system (ETS) activity as an estimator of the thermal tolerance of two *Daphnia* hybrids. *J Plankton Res.* 2004;26(5):525–34.
 253. Yusseppone MS, Rocchetta I, Sabatini SE, Luquet CM, de Molina M del CR, Held C. Inducing the alternative oxidase forms part of the molecular strategy of anoxic survival in freshwater bivalves. *Front Physiol.* 2018;9:1–12.
 254. AOAC 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Gaithersburg, Maryland, USA, AOAC International;

255. European Pharmacopeia 9th Ed., Monograph 0267.
256. International Organization for Standardization. ISO 8466-1:1990. Water Quality- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.
257. Norma Portuguesa NP 2032 (1988). Pescado. Determinação do teor de cinza.
258. Norma Portuguesa NP 2282 (1991). Pescado. Determinação da humidade.
259. Shafakatullah N, Krishnamoorthy M. Nutritional quality in freshwater mussels , *Parreysia spp* . of Periyar River, Kerala, India. *Res J Recent Sci*. 2014;3:267–70.
260. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88–95.
261. Erdelmeier I, Gérard-Monnier D, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4- hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*. 1998;11:1184–94.
262. Guo F, Fang Z, Zhou T. Conversion of fructose and glucose into 5-hydroxymethylfurfural with lignin-derived carbonaceous catalyst under microwave irradiation in dimethyl sulfoxide – ionic liquid mixtures. *Bioresour Technol*. 2012;112:313–8.
263. Weigel S, Kuhlmann J, Hühnerfuss H. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Sci Total Environ*. 2002;295:131–41.
264. Kurissery S, Kanavillil N, Verenitch S, Mazumder A. Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. *Ecol Indic*. 2012;23:501–8.
265. Campillo JA, Albentosa M, Valdés NJ, Moreno-González R, León VM. Impact assessment of agricultural inputs into a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain) on transplanted clams (*Ruditapes decussatus*) by biochemical and physiological responses. *Aquat Toxicol*. 2013;142–143:365–79.
266. Chen Z, Pavelic P, Dillon P, Naidu R. Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode-array detection. *Water Res*. 2002 Nov;36(19):4830–8.
267. Bocquené G, Roig A, Fournier D. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Lett*. 1997;407:261–6.
268. Sheehan D, Power A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp Biochem Physiol - C*. 1999;123:193–9.
269. Pfeifer S, Schiedek D, Dippner JW. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus spp*. from the south-western Baltic Sea. *J Exp Mar Bio Ecol*. 2005;320:93–103.
270. Trombini C, Hampel M, Blasco J. Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: An integrative and multibiomarker approach. *Aquat Toxicol*. 2019;208:146–56.